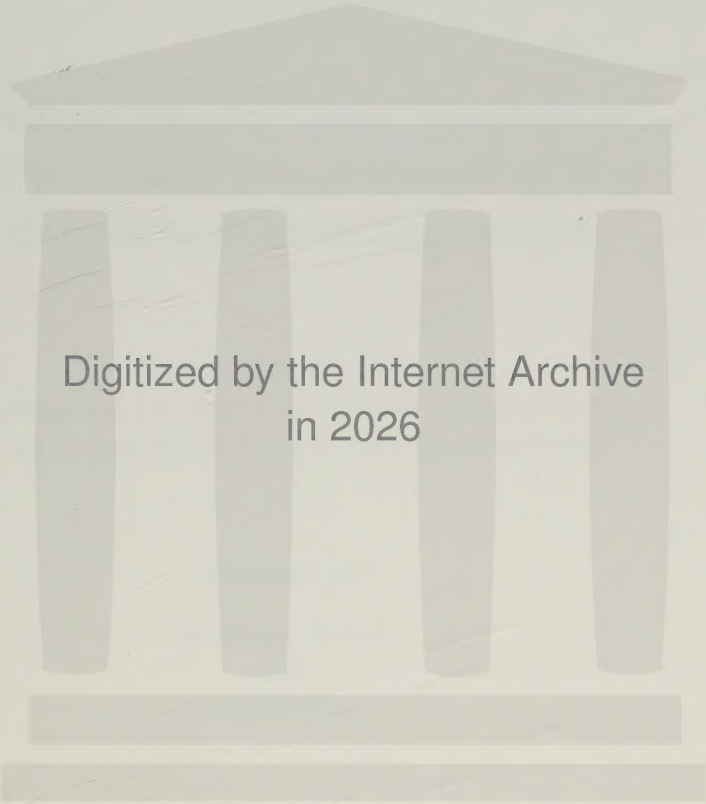


**Bestimmung der Geschwindigkeit
der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion
in der perfundierten Rattenleber**

Wolfgang Braun

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM INSTITUT
FÜR PHYSIOLOGISCHE CHEMIE, PHYSIKALISCHE BIOCHEMIE
UND ZELLBIOLOGIE DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher – Prof. Dr. E. M. Klingenberg
Prof. Dr. F. Miller – Prof. Dr. H. G. Zachau

Bestimmung der Geschwindigkeit der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion in der perfundierten Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Braun
aus
Nördlingen

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. Roland Scholz
 2. Prof. Dr. Dr. Theodor Bücher

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Gerd Müllhofer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 8.2.1977

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Methodik	9
2.1. Leberperfusion	9
2.1.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion	9
2.1.2. Perfusionsapparatur	9
2.1.3. Perfusionslösung	11
2.1.4. Versuchstiere	11
2.1.5. Operationsmethode	11
2.1.6. Die isolierte Leber unter den Bedingungen der Perfu- sion	12
2.1.7. Durchführung der Experimente	14
2.2. Analytik	15
2.2.1. Sauerstoffmessung	15
2.2.2. Enzymatische Bestimmung von Metaboliten	15
2.2.3. $^{14}\text{CO}_2$ -Messung im Perfusat	17
2.2.4. Isolierung von Metaboliten durch Säulenchromatogra- phie	19
2.2.5. Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie	20
3. Ergebnisse und Diskussion	21
3.1. Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Ge- schwindigkeit der PDH-Reaktion mit Hilfe der Decarbo- xylierung von Pyruvat-1- ^{14}C	21
3.1.1. Allgemeine Erörterung des methodischen Problems	21
3.1.2. Die spezifische Aktivität des Lactats als Maß für die Verdünnung des zellulären Pyruvat-Pools	23
3.1.3. Korrektur der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit Hilfe einer Analyse der off-Kinetik	25
3.1.3.1. Off-Kinetiken nach Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C	25
3.1.3.2. Off-Kinetiken nach Infusion von Pyruvat-3- ^{14}C	29
3.1.3.3. Auswaschkinetik der Radioaktivität aus dem Perfusions- system	29
3.1.3.4. Vergleich der off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Py- ruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C	31
3.1.3.5. Unterscheidung der PDH-unabhängigen und PDH-ab- hängigen Anteile der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion	31

	Seite
3.2. Anwendung der Pyruvat-1- ¹⁴ C-Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeit der PDH-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen der perfundierten Leber	37
3.2.1. Abhängigkeit von der extrazellulären Pyruvatkonzentration	37
3.2.2. Effekt von Dichloracetat auf die oxydative Pyruvatdecarboxylierung	38
3.2.3. Temperaturabhängigkeit der PDH-Reaktion	45
3.2.4. Abhängigkeit der PDH-Reaktion von extrazellulären Zuckerkonzentrationen	47
3.2.5. Abhängigkeit der PDH-Reaktion vom Redoxpotential des NAD ⁺ -Systems	48
3.2.6. Abhängigkeit der PDH-Reaktion vom energetischen Zustand	50
3.2.7. Abhängigkeit der PDH-Reaktion von Ammoniumionen . .	54
3.2.8. Abhängigkeit der PDH-Reaktion von der Fettsäureoxydation	56
4. Zusammenfassende Schlußbetrachtung	60
5. Zusammenfassung	63
Literaturverzeichnis	65

1. Einleitung

Der Multienzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase (E.C. 1.2.4.1., PDH) katalysiert im Stoffwechsel der Säugetiere die oxydative Decarboxylierung des Pyruvats zum Acetyl-CoA. Diese Reaktion stellt im Koh-

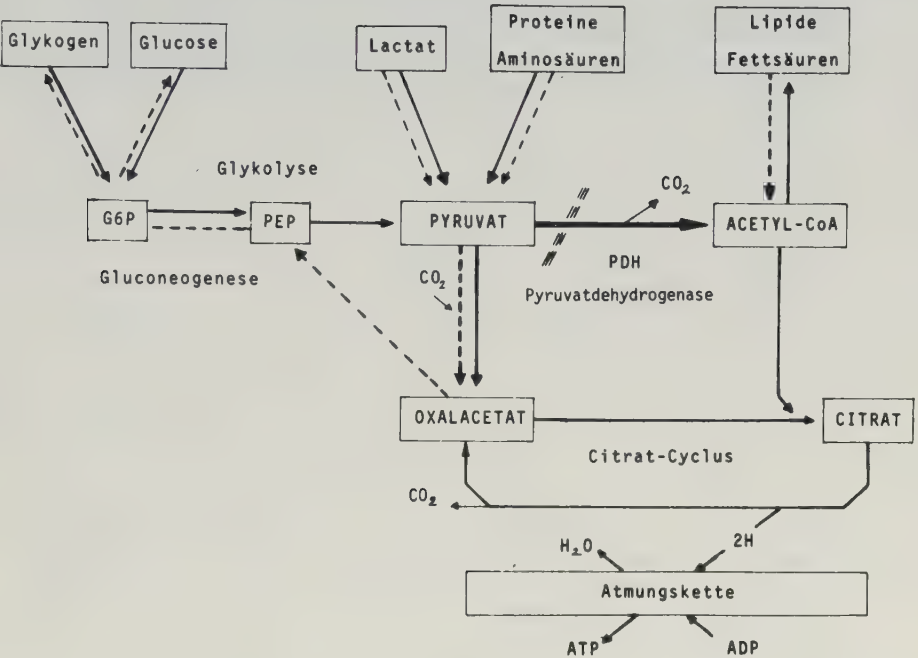


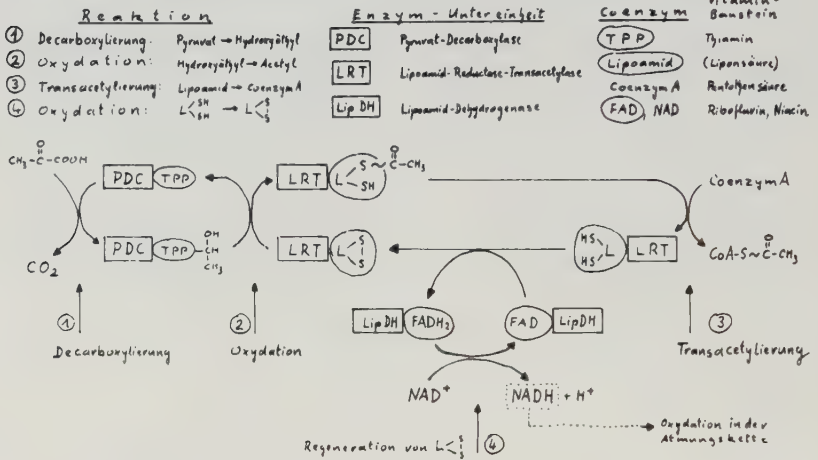
Abb. 1 Stellung der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion im Stoffwechsel der Leber.

lenhydratkatabolismus die Verbindung her zwischen Glycolyse und Citratcyclus und verknüpft außerdem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. In den vergangenen Jahren wurde erkannt, daß die Pyruvatdehydrogenasereaktion ein entscheidender Angriffspunkt bei der Stoffwechselregulation ist (Abb. 1).

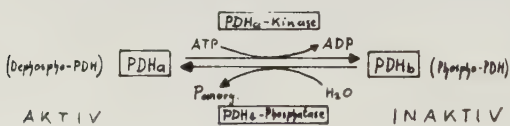
Die PDH ist ein strukturegebundenes mitochondriales Enzym, das zum Matrixraum der Mitochondrien hin orientiert ist. Sein Aufbau und die Mechanismen, die eine Aktivitätsänderung bewirken, wurden im letzten Jahrzehnt intensiv auf verschiedenen Stufen der Komplexität untersucht (isolierte Enzyme, isolierte Mitochondrien und Gewebshomogenate aus verschiedenen Organen und Tierspezies sowie isoliert

Oxydative Decarboxylierung des Pyruvats zu Acetyl-CoAPYRUVAT DEHYDROGENASE

Multienzym-Komplex in der inneren Mitochondrienmembran



PDH: ein „interkonvertierbares Enzym“, Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Serin-Rest der PDC-Untereinheit



	Anteil der aktiven PDH an Gesamt-PDH (%)		
	Gehirn	Herz	Leber
normale Ernährung	80	60	20
Hunger	70	20	<10
Kohlenhydrat-reich	80	80	80

Abb. 2 Aufbau und Funktion des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (Auszug aus einem Vorlesungsskriptum).

perfundierte Organe). Ein entscheidender Durchbruch war dabei die Beobachtung der Arbeitsgruppen um Reed [1, 2] und Wieland [3, 4], daß die PDH ein interkonvertierbares Enzym ist. Sie liegt in einer aktiven und einer inaktiven Form vor. Die inaktive Form ist phosphoryliert (Phospho-PDH oder PDH_b), während bei der aktiven Form diese Phosphatgruppe abgespalten ist (Dephospho-PDH oder PDH_a). Die Inaktivierung erfolgt unter ATP Verbrauch mit Hilfe einer spezifischen Kinase (PDH_a-Kinase); für die Aktivierung ist eine spezifische Phosphatase (PDH_b-Phosphatase) erforderlich [1–8, 23].

Der Multienzymkomplex ist aufgebaut aus einer großen Zahl von Enzym-Untereinheiten, bei denen aufgrund ihrer katalytischen Wir-

kung drei Arten unterschieden werden: die Pyruvat-Decarboxylase mit Thiaminpyrophosphat, die Lipoamid-Reductase-Transacetylase mit Liponsäure und die Lipoamid-Dehydrogenase mit FAD als prosthetische Gruppe [17, 18]. Die Proteinmoleküle der Lipoamid-Reductase-Transacetylase haben nicht nur eine katalytische Funktion, sondern auch die Aufgabe eines Strukturproteins. Sie sind verantwortlich für den räumlichen Aufbau des gesamten Enzymkomplexes [42]. Die Pyruvat-Decarboxylase stellt außerdem den Serinrest, durch dessen Phosphorylierung der Enzymkomplex inaktiviert wird. Die PDH_a -Kinase ist relativ fest an die Lipoamid-Reductase-Transacetylase gebunden, während die PDH_b -Phosphatase wahrscheinlich nur locker mit dem Komplex verbunden ist [1, 9–12] (Abb. 2).

Bei der Regulation der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats in der intakten Zelle wurden zuerst Mechanismen im Sinne einer allosterischen Regulation oder einer Produkthemmung diskutiert. Als wichtige Faktoren kamen die mitochondrialen Konzentrationen von Acyl-CoA und NADH infrage. Nachdem das Phänomen der Interkonvertierung erkannt wurde, konzentrierte sich die Diskussion der Regulation auf diesen Mechanismus. Im folgenden wird ein Überblick gegeben über die derzeitige Erkenntnis hinsichtlich der Faktoren, welche die Interkonvertierung beeinflussen können (Abb. 3).

Es wurden verschiedene Metabolite bekannt, welche auf die PDH_a -Kinase oder auf die PDH_b -Phosphatase einwirken. Über eine Stimulierung oder Hemmung dieser Enzyme können die Metabolite den Aktivitätsgrad der PDH verändern. Einen hemmenden Einfluß auf die PDH_a -Kinase haben Pyruvat, Coenzym A, NAD, ADP und Dichloracetat, während NADH, ATP und Acetyl-CoA dieses Enzym aktivieren. Die PDH_b -Phosphatase dagegen wird durch Magnesium- und Calciumionen stimuliert und möglicherweise durch NADH gehemmt [1, 5, 6, 13, 16, 19, 20, 22, 23].

Bei einer Zusammenschau der Regulationsmöglichkeiten (Abb. 4) kann folgendes gesagt werden: Hohe Quotienten der mitochondrialen Konzentrationen von ATP/ADP, NADH/NAD und Acetyl-CoA/Coenzym A sowie niedrige Konzentrationen von Pyruvat und zweiwertigen Kationen gehen einher mit einem großen Anteil der inaktiven PDH_b an der Gesamt-PDH und umgekehrt. Der Aktivitätsgrad hängt somit ab vom mitochondrialen Phosphorylierungspotential und Redoxpotential sowie von der Beladung des Coenzym A-Systems mit Acetylresten [5, 6, 14, 20, 23, 25–27].

Die Adenosinphosphate wirken auf die Interkonvertierung nicht nur durch Hemmung (ADP) bzw. Stimulierung (ATP) der PDH_a -Kinase, son-

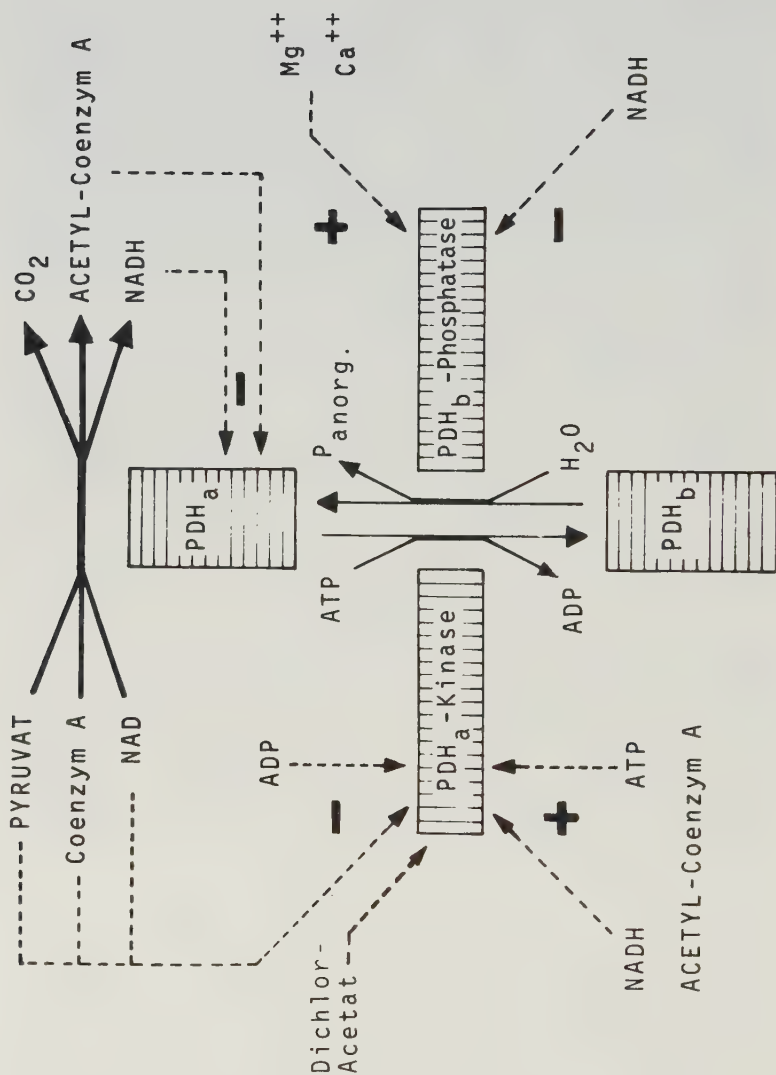


Abb. 3 Überblick über Art und Angriffspunkt der Faktoren, welche die Aktivität der Pyruvat-dehydrogenase in vitro beeinflussen können (Interkonversion PDH_a-PDH_b und „feed back inhibition“ der PDH_a).

Aktivitätsgrad der Pyruvatdehydrogenase

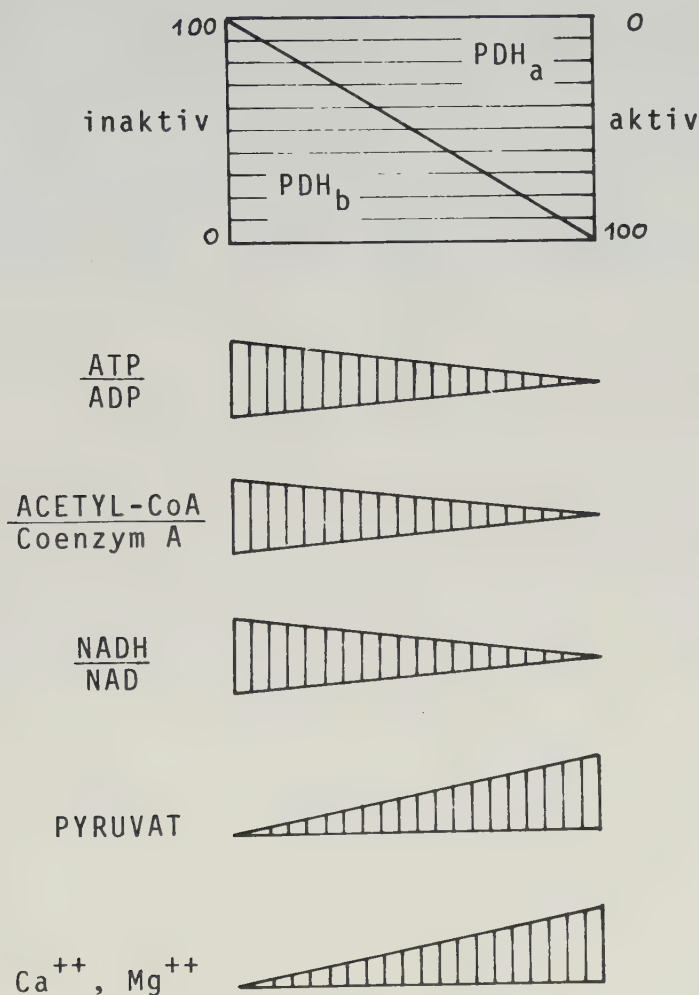


Abb. 4 Abhängigkeit des Aktivitätsgrades der Pyruvatdehydrogenase von verschiedenen metabolischen Systemen (Phosphorylierungspotential, Redoxpotential, Coenzym-A-System) bzw. Konzentrationen (Pyruvat, zweiwertige Kationen).

dern indirekt auch über eine Beeinflussung der PDH_b -Phosphatase. ATP ist ein stärkerer Chelatbildner für Magnesiumionen als ADP. Bei einem hohen ATP/ADP Quotienten werden somit mehr Magnesiumionen gebunden und dadurch die PDH_b -Phosphatase weniger stimuliert als bei einem niedrigen ATP/ADP Quotienten [15].

Tab. 1

Anteil der aktiven PDH an der Gesamt-PDH (%)

	Leber	Herz	Fettgewebe	Gehirn
normale Ernährung	20 [24] 23 [25] 16 [27]	60 [27]	25 [26]	69 [5]
Hunger	10 [24] 10 [27]	15 [27] 10 [5]		67 [5]
kohlenhydratreich	60 [24]	60 [27]	80 [26]	

Der Aktivitätsgrad der PDH wurde in mehreren Geweben unter verschiedenen Ernährungszuständen bestimmt. Tab. 1 gibt eine Übersicht über Ergebnisse in Leber, Herz, Gehirn und Fettgewebe der Ratte. Bei normaler Ernährung ist der Aktivitätsgrad in Leber- und Fettgewebe niedrig, in Gehirn und Herz jedoch hoch. Er sinkt in allen Organen ab, wenn den Tieren die Nahrung entzogen wird, am wenigsten im Gehirn. Bei anschließender kohlenhydratreicher Nahrung steigt der Aktivitätsgrad wieder an, wobei die stärksten Veränderungen in Leber und Fettgewebe beobachtet wurden. Diese Veränderungen stehen im Einklang mit unserem Wissen von den bevorzugten Substraten für den energieliefernden Stoffwechsel der verschiedenen Organe. Das Gehirn, das in allen Ernährungszuständen bevorzugt Glucose abbaut, zeigt die geringsten Veränderungen der PDH-Aktivität. Die Leber und das Fettgewebe dagegen synthetisieren bei kohlenhydratreicher Nahrung Fettsäuren aus Glucose und benötigen dazu hohe PDH-Aktivitäten, während ihr energieliefernder Stoffwechsel bei normaler Ernährung und im Hunger vorwiegend auf Fettsäureoxydation beruht und deshalb nicht auf hohe PDH-Aktivitäten angewiesen ist [4, 5, 22, 24, 26, 27].

Diese Änderungen des Aktivitätsgrades gehen nicht einher mit Änderungen der Gesamtaktivität des Enzyms. Es handelt sich dabei um eine Interkonvertierung des vorhandenen Enzymproteins und nicht um eine Enzymneusynthese [21, 22, 24, 26, 27]. Lediglich beim Übergang zur

Laktation in der Mamma der Ratte wurde neben einer Aktivitätssteigerung durch Interkonvertierung auch eine Zunahme der Gesamtaktivität beobachtet, so daß zusätzlich hier eine Enzyminduktion angenommen werden muß [19].

Die Mechanismen, welche die katalytische Funktion der PDH beeinflussen, wurden am isolierten Enzym und in Gewebshomogenaten erarbeitet. Die Frage nach der Regulation dieses Enzyms im Rahmen einer übergeordneten Stoffwechselregulation wurde bislang vorwiegend durch Messung der Gewebsaktivität der PDH bzw. des prozentualen Anteils der aktiven Form an der Gesamtaktivität untersucht. Gewebsaktivitäten liefern aber lediglich eine Information über die Kapazität, nicht jedoch über die tatsächliche Geschwindigkeit der Reaktion in einer gegebenen Stoffwechselsituation. Kapazität und Durchflußgeschwindigkeit sind nicht zwangsläufig identisch, so daß aufgrund der Gewebsaktivitäten nur begrenzte Aussagen hinsichtlich der metabolischen Leistung und Regulation gemacht werden können. Es ist erforderlich, daß neben der Bestimmung von Gewebsaktivitäten auch der tatsächliche Substratfluß durch die Reaktion gemessen wird, um ein vollständiges Bild der Stoffwechselregulation zu erhalten. Die Ursache für das bisherige Fehlen von Untersuchungen dieser Art liegt in der Tatsache, daß die Produkte der PDH-Reaktion (Acetyl-CoA, CO_2 , NADH) in der Zelle direkt nicht erfaßbar sind. Ein Zugang ist nur möglich über die Decarboxylierung eines spezifisch markierten Substrates (d. i. Pyruvat- $1-^{14}\text{C}$). Die Interpretation der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion ist jedoch erschwert durch die Verdünnung der radioaktiven Vorstufen und durch die Beteiligung von anderen Decarboxylierungsreaktionen (z. B. Citrat-cyclus).

In der vorliegenden Arbeit wird eine Methode vorgestellt, mit der die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion unter verschiedenen metabolischen Zuständen in der perfundierten Rattenleber gemessen werden kann.

Die Methode beruht auf der Messung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat- $1-^{14}\text{C}$. Der Fehler, der durch die Verdünnung der radioaktiven Vorstufe entsteht, wird korrigiert durch Messung der spezifischen Aktivität von Metaboliten, die direkt aus dem zellulären Pyruvat-Pool entstehen und die somit Indikatoren für die Aktivität des Substrates der PDH sind. Infrage kommt hierbei das Lactat im venösen Perfusat. Die Beteiligung von PDH-unabhängigen Decarboxylierungsreaktionen wurde mittels einer Analyse der off-Kinetik der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion beim Auswaschen der Radioaktivität aus der Leber bestimmt. Infolge dieser Korrekturen lassen sich bei der Interpretation jetzt quantitative Angaben über den

Substratdurchsatz durch die PDH machen. Das Verfahren wurde bei folgenden Fragestellungen eingesetzt: Abhängigkeit der oxydativen Phosphorylierung des Pyruvats (a) von der extrazellulären Pyruvatkonzentration, (b) vom mitochondrialen Redoxzustand, (c) vom energetischen Zustand und (d) von der gleichzeitig ablaufenden Fettsäureoxydation.

2. Methodik

2.1. Leberperfusion

2.1.1. Hämoglobinfreie Leberperfusion

Die angestrebte Geschwindigkeitsmessung der PDH-Reaktion unter den Bedingungen der intakten Zelle erfordert die Untersuchung an einem Objekt, in dem die Zellen weitgehend unversehrt erhalten bleiben. Die Methode der Leberperfusion erscheint aus mehreren Gründen dafür geeignet: Die morphologische Organisation entspricht den in vivo Verhältnissen, ebenso die Ernährungssituation durch die Imitierung des Kreislaufprinzips. Weiterhin ist das isolierte Organ den Einflüssen des Gesamtorganismus entzogen und kann gezielten, reproduzierbaren und definierten Versuchsbedingungen unterworfen werden. Rückschlüsse auf physiologische Zustände sind bei dieser Untersuchungsmethodik in weit stärkerem Maße möglich als bei Untersuchungen an Gewebsschnitten, Homogenaten und Zellfraktionen.

Perfusionen isolierter Rattenlebern wurden 1941 erstmals von Corey und Britten [28] und Trowell [29] durchgeführt. 1951 wandten sich gleichzeitig die Arbeitsgruppen von Brauer [30] und Miller [31] dieser Methode zu. Während Miller als Perfusionsmedium heparinisiertes Rattenblut verwendete, benützte Schimassek [32] später ein halbsynthetisches Medium (Salzlösung, Rinderalbumin, gewaschene Rindererythrocyten). Scholz und Bücher [33, 34] gelang mit der Entwicklung der hämoglobinfreien Leberperfusion eine weitere Vereinfachung der Methode. Als Perfusionsmedium wurde eine Salzlösung mit Plasmaexpandern eingeführt. Durch Erhöhung der Durchströmungsgeschwindigkeit konnte, trotz Fehlens des Hämoglobins als Sauerstoffträger, eine ausreichende Versorgung der Leber allein mit physikalisch gelöstem Sauerstoff erreicht werden. Die Ausschaltung des Hämoglobins erlaubte die Anwendung der Platinelektrode zur exakten Messung des Sauerstoffverbrauchs der Leber. Einen weiteren Vorteil brachte die Perfusion im offenen System [39], weil durch das Fehlen einer Akkumulation von Stoffwechselprodukten das Organ definierten Bedingungen unterworfen werden kann. Durch Bestimmung von arteriovenösen Differenzen lassen sich direkt metabolische Geschwindigkeiten erfassen.

2.1.2. Perfusionsapparatur

Die verwendete Perfusionsapparatur besitzt einen Diffusionsoxygenator [39]. Er hat an der Außenseite seines auf 37° C temperierten Aluminiumkernes zwei durch einen Silikonkautschukschlauch getrennte

Räume. Das Perfusionsmedium, das im Innern des für Gase permeablen Schlauches (9 m Länge, 2 mm Durchmesser, 0,2 mm Wandstärke) den Oxygenator durchläuft, wird durch das im Gegenstrom aufsteigende Gasgemisch aufgesättigt. Die Sättigung des Mediums hängt zum einen von der Länge des Schlauches innerhalb des Oxygenators, zum anderen von der Flußgeschwindigkeit des Perfusats ab. Die Länge des Schlauches gewährleistet bei den benutzten Perfusionsgeschwindigkeiten von 30–40 ml/min eine 99%ige Aufsättigung. Die Perfusionslösung wird aus einem Vorratsgefäß mittels einer Rollpumpe durch den Oxygenator gepumpt. Der elastische Schlauch im Oxygenator hat außerdem die Funktion eines Windkessels, so daß die Pulsationen, die durch die Rollpumpe zustande kommen, abgeschwächt werden. Die Perfusionslösung wird nach Verlassen des Oxygenators zunächst durch ein Filter gedrückt (2 Lagen von Scrynel NY 85 HD). Von dort

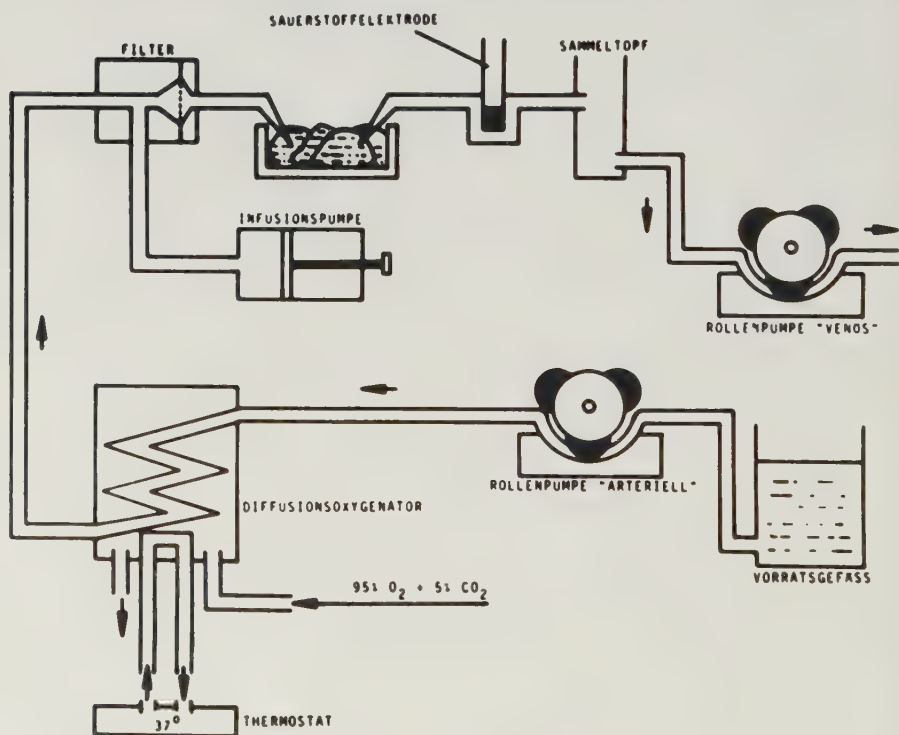


Abb. 5 Schema der Perfusionsapparatur.

gelangt es über eine in die Vena portae eingebundene Kanüle in die Leber. Das Perfusat verläßt das Organ über eine in der Vena cava superior liegende Kanüle. Nach Passage einer Sauerstoffelektrode fließt das Perfusat in einen kleinen Sammeltopf, aus dem es durch eine zweite Rollpumpe rasch abgesaugt wird. Es wird fraktioniert in Erlemeyerkolben aufgefangen. Mit Hilfe von Infusionspumpen, die unmittelbar vor der Leber an das Perfusionssystem angeschlossen sind, lassen sich dem Perfusionsmedium genau definierte Mengen eines Substrats oder Inhibitors pro Zeiteinheit zufügen (Abb. 5).

2.1.3. Perfusionslösung

Die Perfusionslösung besteht aus einer Elektrolytlösung, wie sie von Krebs und Henseleit erstmals angegeben wurde [35] (Tab. 2). Die Perfusionslösung wird mit 95% O₂ und 5% CO₂ aufgesättigt. Durch den Bicarbonatpuffer (25 mM HCO₃, 5 Vol% CO₂) ist der pH Wert auf 7,4 eingestellt.

Tab. 2

NaCl	115 mM	MgCl ₂	1,18 mM
NaHCO ₃	25 mM	NaH ₂ PO ₄	1,24 mM
KCl	5,9 mM	CaCl ₂	2,50 mM
Na ₂ SO ₄	1,2 mM		

2.1.4. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 160–200 g aus der Tierzucht der Firma Dr. K. Thomae (Biberach). Die Tiere erhielten Altrumin Standard Nahrung (Fa. Altrogge, Lage) und Wasser ad libitum. In einigen Fällen wurde den Tieren 24 Stunden vor der Operation die Nahrung entzogen.

2.1.5. Operationsmethode

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von Nembutal (5 mg/100 g) narkotisiert. Zu Beginn der Operation wird das Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet, anschließend der Magen freipräpariert, vom Oesophagus abgetrennt und zur Seite geklappt. Die Vena cava wird dicht oberhalb des Abgangs der Nierenvenen umschlungen. Um die Vena portae werden zwei lockere Ligaturen gelegt, wobei der am weitesten leberwärts gelegene Zufluß erfaßt werden muß. Nach Incision der Pfortader wird eine Polyäthylenkanüle bei langsam laufen-

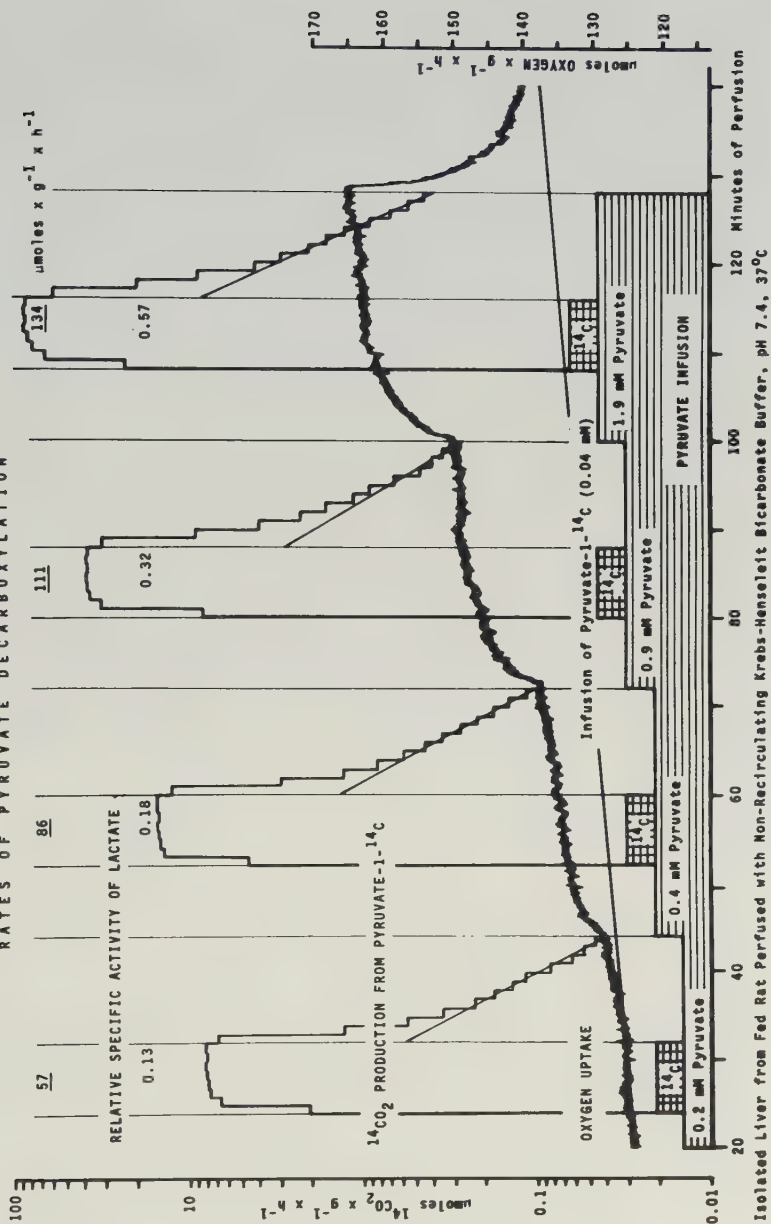
der Perfusionspumpe (10–15 ml/min) eingeschoben und eingebunden. Innerhalb von 2–3 sec ist die Leber entblutet und zeigt ihre gelblich-braune Eigenfarbe. Nach Ligatur der Vena cava inf. wird der Thorax parasternal eröffnet. Durch das rechte Herzohr wird eine Polyäthylenkanüle in die Vena cava sup. bis zur Einmündung der Lebervenen vorgeschoben und zur besseren Fixierung zusammen mit einem Zwerchfellzipfel eingebunden. Die Perfusionsgeschwindigkeit wird nun auf 25–30 ml/min gesteigert. Nach Präparation aus dem Situs wird die Leber in das vorbereitete Gefäß gehängt. Die gesamte Operation dauert 7–8 Minuten. Davon entfallen auf die Zeit vom Einführen der Pfortaderkanüle bis zum Einbinden der Cavakanüle ungefähr 2 Minuten. Nur während dieser Phase der Operation ist die Leber nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt.

2.1.6. Die isolierte Leber unter den Bedingungen der Perfusion

Die Leber in situ wird von zwei Gefäßsystemen mit Blut versorgt (Vena portae und Arteria hepatica), die sich am Anfangsteil oder innerhalb der kapillären Endstrecke vereinigen und über ein gemeinsames System abgeleitet werden. Die A. hepatica, die an der Sauerstoffversorgung der Leber zu etwa 40% beteiligt ist [36], versorgt aufgrund der anatomischen Gegebenheiten keine eigenen Gefäßbezirke. Ihre Funktion ist lediglich, das venöse Pfortaderblut zu arterialisieren, bevor es in Sauerstoffaustausch mit den Leberzellen tritt. Durch die besondere Gefäßanordnung können die Leberzellen auch nach Ausschaltung der A. hepatica mit Sauerstoff versorgt werden, wenn das über die Pfortader eintretende Blut bzw. Perfusat damit gesättigt ist.

Abb. 6 Protokoll des Versuchsablaufs eines typischen Perfusionsexperiments. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Pyruvatdehydrogenase-Reaktion von der Pyruvatkonzentration im Perfusat. Die isolierte Leber einer normal gefütterten Ratte wurde mit nicht-rezirkulierender Krebs-Henseleit-Lösung, pH 7,4, 37° C, perfundiert. Das Einsetzen und die Dauer der Infusionen von inaktivem Pyruvat mit stufenweiser Erhöhung der Konzentrationen (Angabe der Endkonzentrationen im arteriellen Perfusat) und von Tracer-Mengen an Pyruvat-1-¹⁴C sind durch horizontale Balken angegeben. Abszisse: Perfusionsdauer in Minuten; linke Ordinate: logarithmische Auftragung der Geschwindigkeit der ¹⁴CO₂-Produktion (Treppenkurven); rechte Ordinate: Sauerstoffkonzentration im venösen Perfusat (Originalregistrierung), umgerechnet in Geschwindigkeiten des Sauerstoffverbrauchs. Die metabolischen Geschwindigkeiten sind angegeben in $\mu\text{Mol pro Gramm Leber (Feuchtgewicht) pro Stunde}$. Die Zahlen am oberen Rand der Abbildung entsprechen Geschwindigkeiten der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung, berechnet aus der ¹⁴CO₂-Produktion nach Korrektur mittels der off-Kinetik und bezogen auf die spezifische Aktivität des Lactats im venösen Perfusat (siehe Abschnitte Ergebnisse, Diskussion).

RATES OF PYRUVATE DECARBOXYLATION



2.1.7. Durchführung der Experimente

Bei sämtlichen Versuchen wurde nach Beendigung der Operation und Einstellung der Perfusionsgeschwindigkeit eine Vorperfusion durchgeführt, bis die Leber sich in einem stationären Zustand befand, was durch die Messung der venösen Sauerstoffkonzentration erfaßt wurde. Dann wurden die ersten Perfusatproben entnommen. Anschließend wurde mit der Infusion der verschiedenen Metabolite begonnen. Nachdem die Leber bei jeder Substratinfusion einen neuen stationären Zustand gefunden hatte, erfolgte eine sechsminütige Infusion von radioaktiv markiertem Pyruvat. Die Pyruvatkonzentration war dabei sehr niedrig, um die Änderung des arteriellen Angebots möglichst gering zu halten. Anschließend wurde unter unveränderten äußeren Bedingungen für mindestens 12 Minuten die Radioaktivität aus der Leber ausgewaschen. Nach dieser Auswaschphase wurde entweder die arterielle Substratkonzentration verändert oder es wurden zusätzliche Substanzen infundiert. Nach einer Äquilibrierungsphase von mindestens 6 Minuten wurde erneut Pyruvat als radioaktiver Tracer infundiert. Bei allen Änderungen der Perfusionsbedingungen wurde darauf geachtet, möglichst nur einen Faktor auf einmal zu verändern, um Auswirkungen eindeutig zuordnen zu können. Nach Beendigung des Experiments wurde die Leber aus dem Perfusionssystem herausgenommen und ihr Feuchtgewicht bestimmt. Die arteriellen Konzentrationen der Substrate wurden nach Beendigung des Experiments unter identischen Perfusions- und Infusionsbedingungen, jedoch ohne Leber, bestimmt (Abb. 6).

2.2. Analytik

2.2.1. Sauerstoffmessung

Der im Perfusionsmedium physikalisch gelöste Sauerstoff wird amperometrisch mit einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Es handelt sich dabei um eine Modifizierung der von Clark erstmals 1953 [37] beschriebenen Meßanordnung. Die Elektrode besteht aus einer Platinkathode und einer Ag/AgCl Anode, verbunden durch eine KCl-Lösung und vom Perfusionsmedium getrennt durch eine gasdurchlässige Teflonmembran. Beim Anlegen einer Spannung wird an der Platinoberfläche eventuell vorhandener Sauerstoff reduziert. Der dabei entstehende Reduktionsstrom ist der Sauerstoffkonzentration proportional, wenn im Meßkreis eine Polarisationsspannung von 0,7 Volt angelegt ist. Die Elektrode wird mit Perfusionslösung, die einmal mit Luft, einmal mit einem definierten Gasgemisch gesättigt ist, bzw. die nach Infusion von Natriumdithionit sauerstofffrei ist, geeicht. Die Atmungsgröße des isolierten Organs ist bei konstanter Durchströmungsgeschwindigkeit proportional der Differenz der Sauerstoffdrucke vor und hinter der Leber. Der arterielle Wert wird in unserer Meßanordnung nicht kontinuierlich registriert; er wird vor und nach dem Perfusionsexperiment gemessen. Die Atmungsgröße wird aus der arteriovenösen Differenz der Sauerstoffdrucke (AVD), der Durchströmungsgeschwindigkeit (D) und dem Feuchtwert (FG) nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Atmungsgröße} = \frac{\text{AVD} \cdot a \cdot 2 \cdot D}{1013 \cdot M \cdot \text{FG}} \mu\text{gAtome O/Std/g}$$

a = Bunsen'scher Absorptionskoeffizient = 0,023 ml O₂ gelöst in 1 ml 0,9% NaCl bei 1013 mbar, 37° C

M = Molvolumen = 22,4 · 10³ ml.

2.2.2. Enzymatische Bestimmung von Metaboliten

Die Perfusatsproben wurden aus dem Sammelgefäß unmittelbar nach Passage der Sauerstoffelektrode bzw. aus den Erlenmeyerkolben entnommen und in mit Testgemisch vorbereitete Reaktionsgefäße gegeben. Die enzymatische Bestimmung der Metabolite erfolgte nach der Methode des optischen Tests nach Warburg [38]. NADH und NADPH absorbieren Licht im nahen Ultraviolett (Maximum bei 340 nm), ihre oxidierten Partner hingegen nicht. Änderungen der Konzentration von NADH und NADPH während eines Reaktionsablaufes können aus der

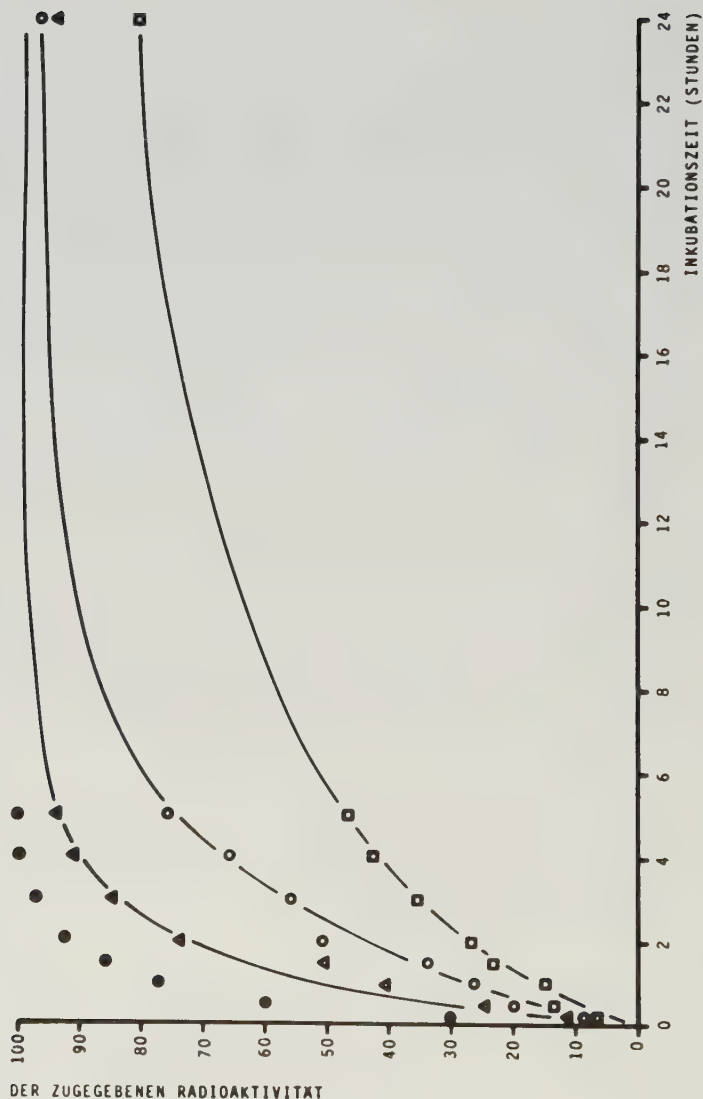


Abb. 7 Zeitliche Abhängigkeit der Austreibung des $^{14}\text{CO}_2$ aus Bicarbonat-Puffer (25 mM) und der Absorption in Phenyläthylamin (1 ml). Perfusatfraktionen mit verschiedenen Volumina (Δ 20 ml, $\circ$ 40 ml, $\square$ 60 ml) wurden entweder während der angegebenen Zeit (Abszisse) geschüttelt (30 strokes/min) ($\bullet$) oder unbewegt stehen gelassen ($\triangle$ $\circ$ $\square$). Ordinate: Wiedergefundene Radioaktivität, angegeben als Prozent der Radioaktivität, die dem Puffer zugegeben wurde.

gemessenen Extinktion errechnet werden. Im einfachen optischen Test sind an der Meßreaktion Pyridinnukleotide beteiligt; im zusammengesetzten optischen Test sind sie indirekt über eine NAD abhängige Indikatorreaktion beteiligt. Aus der Extinktionsdifferenz läßt sich die Menge der zu messenden Substanz berechnen, sofern die Gleichgewichtskonstante die Endprodukte einer Seite stark begünstigt (z. B. bei der Pyruvatbestimmung). Bei ungünstiger Lage des Gleichgewichts kann durch Zugabe von Reagenzien, die das Endprodukt laufend aus dem Gleichgewicht entfernen, ein quantitativer Umsatz erreicht werden (z. B. bei der Lactatbestimmung).

Enzymatisch bestimmt wurden:

Glucose, Lactat, Pyruvat, Acetoacetat, β -Hydroxybutyrat, Ammoniak und Harnstoff.

2.2.3. $^{14}\text{CO}_2$ -Messung im Perfusat

Das ausfließende Perfusat wurde in Zeitabständen von 15, 30, 60 oder 120 sec in 250 ml Enghals-Erlenmeyer-Kolben gesammelt. Die Größe einer Fraktion hing ab von der Notwendigkeit der zeitlichen Auflösung für die off-Kinetik, d. h. eine sehr rasche Fraktionierung erfolgte am Anfang der Auswaschphase. Die Kolben wurden anschließend mit einem doppeldurchbohrten Gummistopfen verschlossen. Durch die eine Bohrung zog sich ein Draht, an dessen unterem Ende ein Zählgefäß für die Liquidszintillationsmessung befestigt war, das 1 ml Phenyläthylamin als CO_2 -Absorber enthielt. Durch die zweite Bohrung war ein Polyäthylenschlauch gezogen, der mit einem Stopfen dicht verschlossen war, so daß der Erlenmeyerkolben luftdicht verschlossen war. Durch den Polyäthylenschlauch wurde anschließend 1 N HCl in das Perfusat gespritzt, um CO_2 auszutreiben (4 ml HCl auf eine 2 min Fraktion = ca. 70 ml, entsprechende Mengen auf die anderen Fraktionen). Nach 24-stündigem Stehen war das im Perfusat enthaltene CO_2 vollständig in Phenyläthylammoniumcarbonat überführt (Abb. 7). Der Inhalt des Zählgefäßes wurde in 10 ml Szintillationsflüssigkeit gelöst und seine Radioaktivität gemessen. Die Kapazität des CO_2 Absorptionssystems war ausreichend, um das in einer Perfusatfraktion enthaltene CO_2 vollständig zu binden, wie aus Proportionalitätsmessungen zu erkennen war (Abb. 8).

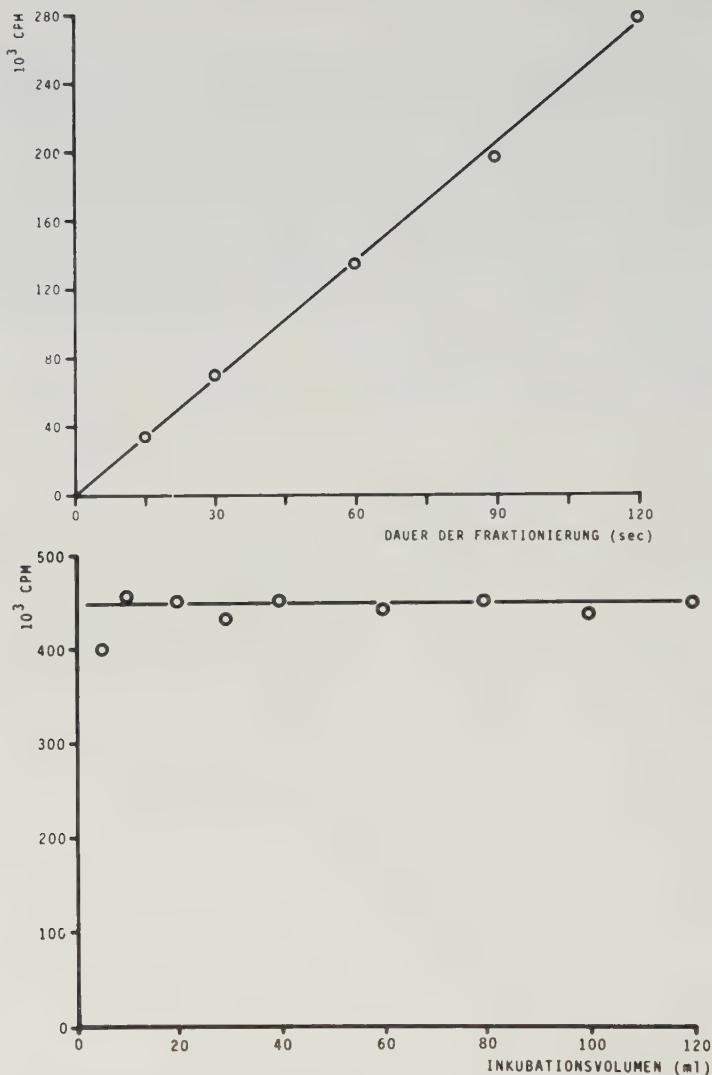


Abb. 8 Kapazität des CO_2 -Absorptionssystems.

A Bei konstanter Infusion von Pyruvat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ und nach Erreichen des Maximalwertes der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion wurde das Perfusat in 15, 30, 60, 90 und 120 sec Fraktionen (Abszisse) aufgenommen. Ordinate: Radioaktive Zerfälle des im Phenyläthylamin aufgefangenen $^{14}\text{CO}_2$. Unter diesen Bedingungen ist die gemessene Radioaktivität dem Perfusatvolumen (d. i. Dauer der Fraktion) proportional.

B Zu verschiedenen Volumina (Abszisse) eines 25 mM Bicarbonat-Puffers wurde die jeweils gleiche Menge von radioaktiv markiertem Bicarbonat gegeben. Ordinate: Radioaktivität im Phenyläthylamin nach 6-stündiger Austreibungs- und Absorptionsperiode unter Schütteln (siehe Abb. 7).

2.2.4. Isolierung von Metaboliten durch Säulenchromatographie

Die intrazelluläre Verdünnung von Pyruvat-1-¹⁴C wurde durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität des Lactats ermittelt. Dazu war es notwendig, im Perfusat das Lactat von ebenfalls radioaktiv markierten Glucose und Pyruvat abzutrennen. Die Isolierung des Lactats erfolgte durch Ionenaustausch [40]. Anionenaustauscherharz (Dowex 1X8,

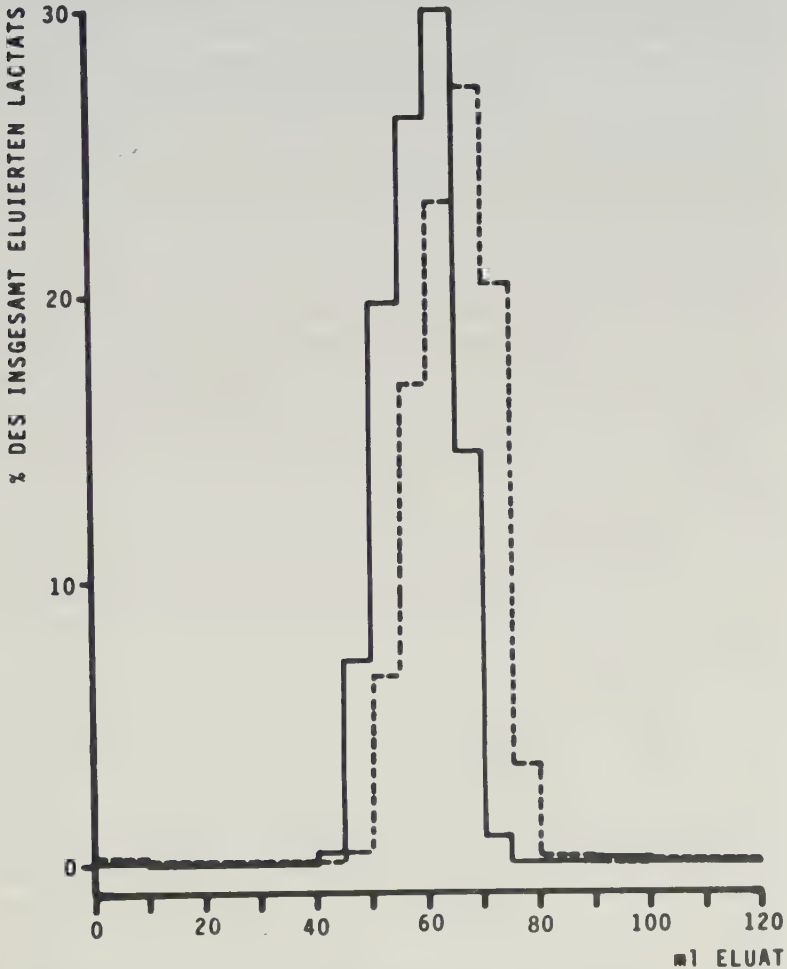


Abb. 9 Isolierung von Lactat aus dem Perfusat durch Anionenaustauschchromatographie. Eluierung von Lactat mit 0,6 N Ameisensäure bei 36 cm (—) und bei 43 cm (----) hoher Ionenaustauscherfüllung. Dem Lactat wurden Tracer-Mengen von Lactat-1-¹⁴C zugesetzt; seine Eluierung wurde durch Messung der Radioaktivität verfolgt.

mesh 200–400) wurde mehrere Tage in bidestilliertem Wasser gequollen und dann mit 2,5 N Natriumformiatlösung von der Chloridform in die Formiatform überführt. Anschließend wurde das Ionenaustauscherharz solange mit bidestilliertem Wasser gewaschen, bis der pH Wert 5 erreicht war, um den Formiatüberschuß zu beseitigen. Die Austauschkapazität des Harzes betrug $1,4 \mu\text{äquival/ml}$. Das Austauscherharz wurde in Säulen gefüllt (1 cm Durchmesser, 36–43 cm Höhe). Anschließend wurden 20 ml Perfusat aufgetragen. Zuerst wurde mit 100 ml bidestilliertem Wasser die Glucose eluiert, anschließend mit 50 ml 0,6 N Ameisensäure das Lactat (Abb. 9). Die genannten Volumina und die Ameisensäurekonzentration wurden in Vorversuchen mit radioaktiv markierter Glucose, Lactat und Pyruvat ermittelt. Glucose wurde unter diesen Bedingungen vollständig eluiert. Aus dem breiten Lactat-Peak wurden nur die Peakfraktionen weiterverarbeitet. Lactat wurde folglich nicht quantitativ erfaßt, was auch nicht nötig war, da nur die spezifische Aktivität interessierte. Das Eluat wurde jeweils im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft und mit 1,0 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Dadurch gelang es, die radioaktiven Metabolite im Hinblick auf eine größere Meßgenauigkeit zu konzentrieren und gleichzeitig die Ameisensäure zu beseitigen. Zum Schluß wurde die Radioaktivität sowohl des Lactats als auch der Glucose gemessen und die Konzentration des Lactats enzymatisch bestimmt.

2.2.5. Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometrie

Die Radioaktivität wurde mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung in einem Liquid Scintillation Spectrometer Modell 2405 der Firma Packard gemessen. Das verwendete Szintillationssystem hatte folgende Zusammensetzung:

1350 ml Toluol

127 ml Äthanol

633 ml 2-Methoxyäthanol

350 mg 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP)

11,6 g 2,5 Diphenyloxazol (PPO).

Es wurden jeweils 10 ml Szintillator mit $100 \mu\text{l}$ der zu messenden Probe versetzt und zehn Minuten lang gezählt. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt. Jede Zählung wurde durch Abzug des Nullwertes korrigiert. In Stichproben wurde durch Zusatz eines internen Standards (^{14}C -Toluol) der Quenchfaktor der wäßrigen Lösungen bestimmt. Die Quenchfaktoren der arteriellen Perfusatsproben, der $^{14}\text{CO}_2$ -Messungen und der Eluatproben wichen in der Regel nur unwesentlich voneinander ab.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Entwicklung einer Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeit der PDH-Reaktion mit Hilfe der Decarboxylierung von Pyruvat-1-¹⁴C

3.1.1. Allgemeine Erörterung des methodischen Problems

Die Bestimmung der Geschwindigkeit der PDH-Reaktion gestaltet sich schwierig, weil keines der intrazellulär entstehenden Reaktionsprodukte (CO_2 , Acetyl-CoA, NADH) direkt faßbar ist. Die hier vorgestellte Methode verwendet zur Messung der PDH-Reaktionsgeschwindigkeit das aus der Decarboxylierung von Pyruvat-1-¹⁴C entstehende radioaktive CO_2 . Die Messung der ¹⁴ CO_2 -Produktion ermöglicht aus folgenden Gründen aber keine quantitative Bestimmung der PDH-Aktivität: (1) Das infundierte Pyruvat-1-¹⁴C wird im zellulären Stoffwechsel durch inaktives Pyruvat, das im Kohlenhydrat- und Aminosäurenkatabolismus entsteht, verdünnt. Für eine quantitative Berechnung der CO_2 -Produktion ist aber die spezifische Aktivität des Praekursors (d. i. mitochondriales Pyruvat) erforderlich. (2) Von dem infundierten Pyruvat-1-¹⁴C kann zwar auf direktem Wege ¹⁴ CO_2 nur in der PDH-Reaktion abgespalten werden. Pyruvat kann jedoch auch auf anderen Wegen metabolisiert werden, wobei indirekt ebenfalls ¹⁴ CO_2 entsteht. Es ist deshalb erforderlich, (1) die spezifische Aktivität des zellulären Pyruvats zu erfassen und (2) die Gesamt-¹⁴ CO_2 -Produktion um den Anteil zu korrigieren, der durch PDH-unabhängige Reaktionen entsteht.

Folgende Reaktionen kommen für die ¹⁴ CO_2 -Produktion zusätzlich infrage (Abb. 10): Durch die Carboxylierung des Pyruvats in der mitochondrialen Pyruvatcarboxylase-Reaktion entsteht Oxalacetat, das zunächst am C-1-Atom markiert ist. Das Oxalacetat steht aber in einer Gleichgewichtsreaktion mit Malat und Fumarat. Infolge der Symmetrie des Fumaratmoleküls geht bei der Rückreaktion zum Oxalacetat die eindeutige Lokalisierung des ¹⁴C-Atoms verloren. Die Radioaktivität wird somit gleichmäßig auf das C-1-Atom und auf das C-4-Atom des Oxalacetats verteilt. Im weiteren Verlauf des Citratcyclus wird durch die Isocitratdehydrogenase vom Isocitrat CO_2 abgespalten, wobei das C-Atom entsprechend die gleiche Radioaktivität hat wie das C-4-Atom des Oxalacetats. Bei dem nachfolgenden Reaktionsschritt vom α -Ketoglutarat zum Succinyl-CoA, katalysiert durch die α -Ketoglutaratdehydrogenase, wird ebenfalls CO_2 abgespalten, welches das C-1-Atom des Oxalacetats enthält und somit die gleiche radioaktive Spezifität aufweist wie dieses Atom. Im Citratcyclus entsteht also nach Infusion von

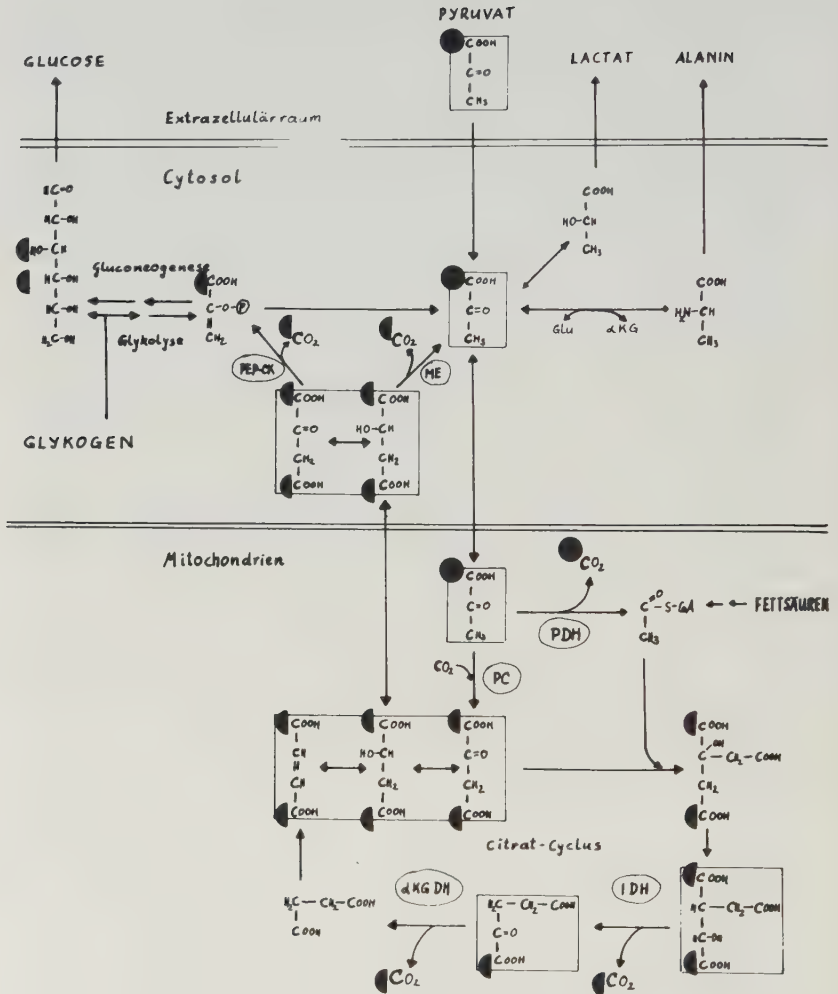


Abb. 10 Verteilung der Radioaktivität aus Pyruvat-1-¹⁴C im Stoffwechsel der Leber. Die theoretisch zu erwartende spezifische Aktivität der Kohlenstoffatome ist durch Vollkreise (relative spezifische Aktivität = 1) oder Halbkreise (relative spezifische Aktivität = 0,5) unter der Annahme, daß keine Verdünnung des zellulären Pyruvatpools erfolgt, angegeben.

Pyruvat-1- ^{14}C bei zwei Reaktionen radioaktives CO_2 , welches nicht gesondert erfaßt werden kann.

Weiterhin entsteht radioaktives CO_2 bei Reaktionen im Cytosol. Tritt das bereits symmetrisch markierte Malat aus den Mitochondrien ins Cytosol über, wo es sich wiederum mit Oxalacetat ins Gleichgewicht setzt, so kann durch die decarboxylierende Malatdehydrogenase („malic enzyme“) $^{14}\text{CO}_2$ abgespalten werden, wobei wieder Pyruvat entsteht. Dieses abgespaltene CO_2 enthält ebenfalls die gleiche Radioaktivität wie das endständige C-Atom des Malats. Außerdem kann vom cytosolischen Oxalacetat $^{14}\text{CO}_2$ abgespalten werden, wenn es in der Carboxykinase-Reaktion zu Phosphoenolpyruvat decarboxyliert wird. Dieses CO_2 hat ebenfalls die gleiche Radioaktivität wie die endständigen Atome des Oxalacetats. Die im Phosphoenolpyruvat verbleibende radioaktive Markierung gelangt durch die Reaktionen der Gluconeogenese in das Glucosemolekül.

Bei der Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C entsteht folglich neben der PDH-Reaktion noch bei mindestens vier anderen Reaktionen radioaktives CO_2 . Es ist deshalb nicht möglich, die $^{14}\text{CO}_2$ -Gesamtproduktion als Parameter für die PDH-Reaktion zu benutzen.

3.1.2. Spezifische Aktivität des Lactats als Maß für die Verdünnung des zellulären Pyruvat-Pools

Um von dem gemessenen radioaktiven CO_2 auf das gesamte gebildete CO_2 schließen zu können, ist entweder die spezifische Aktivität des CO_2 oder des unmittelbaren Praekursors nötig. Das bei der PDH-Reaktion entstehende CO_2 sollte dieselbe spezifische Aktivität wie das mitochondriale Pyruvat haben. Da das Pyruvat in den Mitochondrien ausschließlich aus dem extramitochondrialen Raum stammt (d.h. es ist keine mitochondriale Pyruvat erzeugende Reaktion bekannt), kann angenommen werden, daß die spezifische Aktivität des Praekursors für die PDH-Reaktion der Aktivität des intrazellulären Pyruvats entspricht. Das infundierte radioaktive Pyruvat wird in den Zellen durch Pyruvat verdünnt, das durch Glycolyse, Aminosäurenabbau etc. entsteht. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des intrazellulären Pyruvats könnte die spezifische Aktivität von Metaboliten herangezogen werden, die im zellulären Stoffwechsel ausschließlich aus Pyruvat entstehen und unverändert die Zellwand permeieren. In erster Linie kommt hierfür das Lactat infrage; mit Einschränkungen aber auch das Alanin.

Pyruvat und Lactat stehen in einem Redoxgleichgewicht, das sich aufgrund der hohen Aktivität der Lactatdehydrogenase rasch ausbil-

det. Deshalb ist zu erwarten, daß ihre spezifischen Aktivitäten in der Zelle nahezu gleich sind. Da Lactat die Zellmembran permeiert, sollten die spezifischen Aktivitäten des extrazellulären und des intrazellulären Lactats gleich sein. Folglich kann das venöse Lactat als Indikator für die spezifische Aktivität des intrazellulären Pyruvats verwendet werden. Die Verdünnung des Pyruvats hängt von der Konzentration des arteriellen Pyruvats ab, wie in Abb. 11 zu erkennen ist.

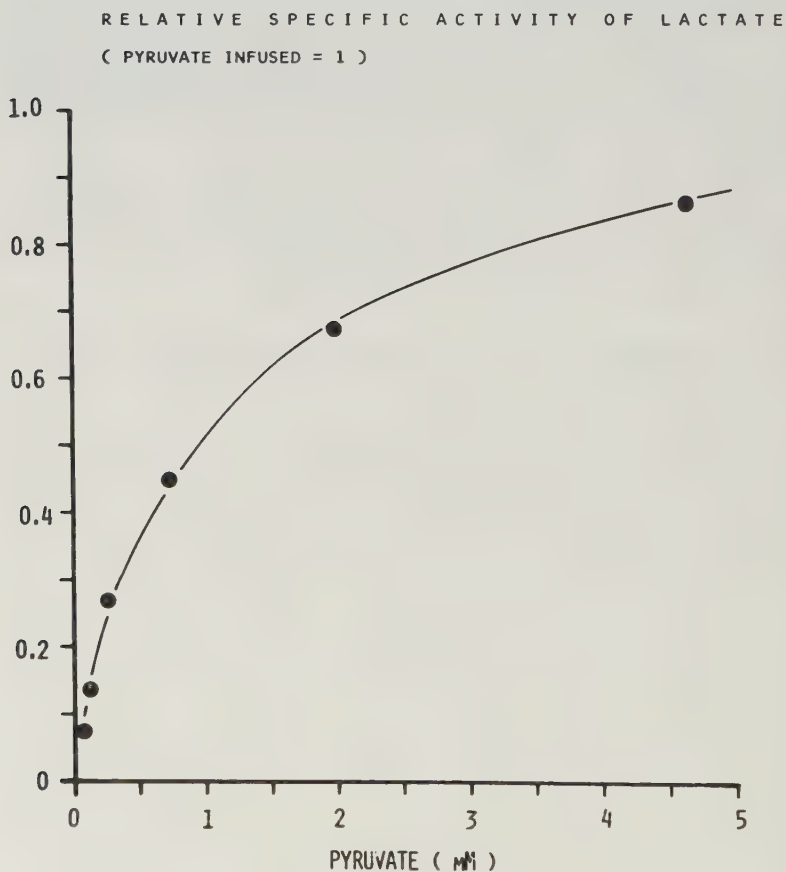


Abb. 11 Abhängigkeit zwischen relativer spezifischer Aktivität des Lactats (Ordinate) und der Konzentration des infundierten Pyruvats (Abszisse).

3.1.3. Korrektur der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion mit Hilfe einer Analyse der off-Kinetik

Eine Zuordnung der Produktion von radioaktivem CO_2 zu den verschiedenen Decarboxylierungsreaktionen wurde mit Hilfe einer Analyse der sog. „off-Kinetik“ nach Absetzen der Infusion von radioaktivem Pyruvat versucht. Im folgenden werden die Kinetiken verschiedener Parameter nach Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C beschrieben.

3.1.3.1. Off-Kinetiken nach Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C

Wenn Pyruvat-1- ^{14}C in Tracermengen in das arterielle Perfusat, das eine bestimmte Pyruvatkonzentration enthält, infundiert wird, steigt die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion rasch an und erreicht nach zwei Minuten nahezu ein Maximum. In Abb. 12, die ein repräsentatives Experiment wiedergibt, ist die Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion (bezogen auf die spezifische Aktivität des arteriellen Pyruvats) im logarithmischen Maßstab dargestellt. Nach Absetzen der Infusion fällt die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion rasch ab. Die Abklingkurve läßt verschiedene Abschnitte erkennen, so daß vermutet werden kann, daß sie sich aus mindestens drei Kinetiken zusammensetzt. Die langsamste Kinetik hat eine Halbwertszeit von 16 Minuten. Wenn man diese Kinetik auf den Endpunkt der Pyruvat-1- ^{14}C Infusion extrapoliert und die theoretischen Werte von den gemessenen Werten subtrahiert, erhält man eine Kinetik mit einer Halbwertszeit von 150 Sekunden. Verfährt man in gleicher Weise mit dieser Kinetik, so läßt sich eine weitere Kinetik mit einer Halbwertszeit von 20 Sekunden herausarbeiten.

Die spezifischen Aktivitäten von Lactat und Glucose wurden im venösen Perfusat bestimmt. Sie sind in Abb. 13 als relative spezifische Aktivitäten (arterielles Pyruvat = 100%) im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Die spezifische Aktivität des Lactats steigt nach Pyruvat-1- ^{14}C Infusion an und erreicht nach 2 bis 3 Minuten ein Maximum. In dem beschriebenen Experiment (Abb. 13) betrug die spezifische Aktivität schließlich 50% der Aktivität des arteriellen Pyruvats, so daß bei der gegebenen Pyruvatkonzentration (0,4 mM) eine Verdünnung der Radioaktivität im intrazellulären Pyruvat-Pool um den Faktor 2 angenommen werden kann. Dagegen steigt die spezifische Aktivität der Glucose deutlich langsamer an und erreicht auch nach 6 Minuten noch keinen Endwert. Zu diesem Zeitpunkt beträgt in dem beschriebenen Experiment die spezifische Aktivität der Glucose 3% der Aktivität des arteriellen Pyruvats. Nach Beendigung der Tracerinfusion fällt die spezifische Aktivität sowohl des Lactats als auch der Glucose rasch ab. Der Abfall

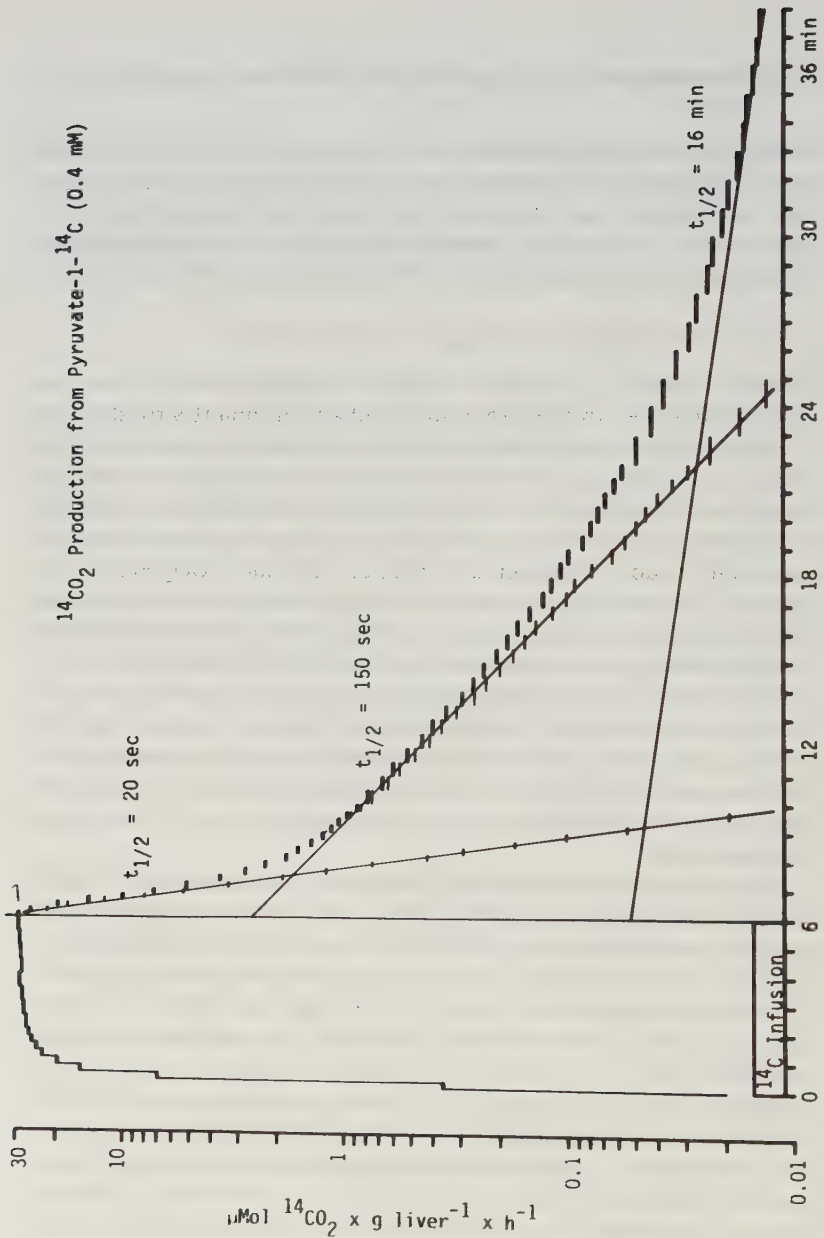


Abb. 12 Halblogarithmische Darstellung der on- und off-Kinetik der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion nach Infusion von Tracermengen an Pyruvat-1- ^{14}C . Das Perfusat enthielt 0,4 mM Pyruvat. Bestimmung der Halbwertszeiten siehe Text.

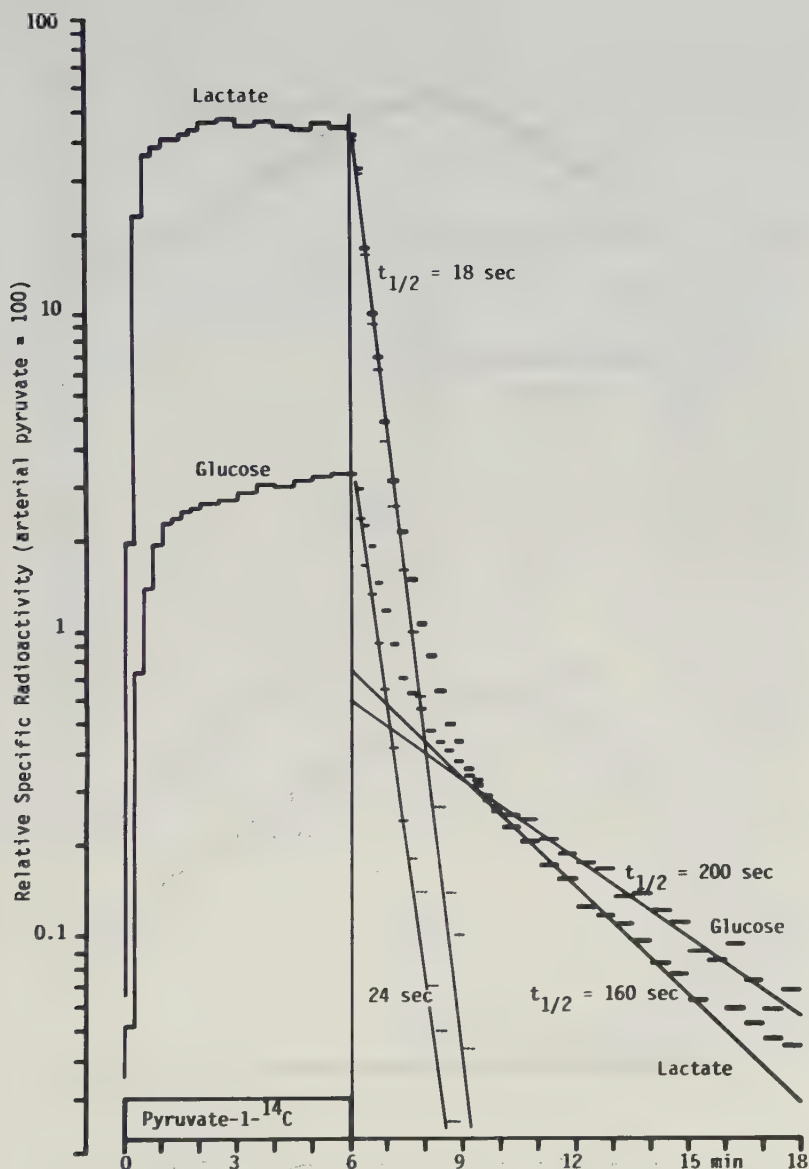


Abb. 13 Der zeitliche Verlauf der relativen spezifischen Aktivitäten von Lactat und Glucose während eines Experiments mit Infusion von Tracermengen an Pyruvat-1-¹⁴C in Anwesenheit von 0,4 mM Pyruvat. Ordinate: relative spezifische Aktivität im logarithmischen Maßstab, arterielles Pyruvat = 1; Abszisse: Zeit in min.

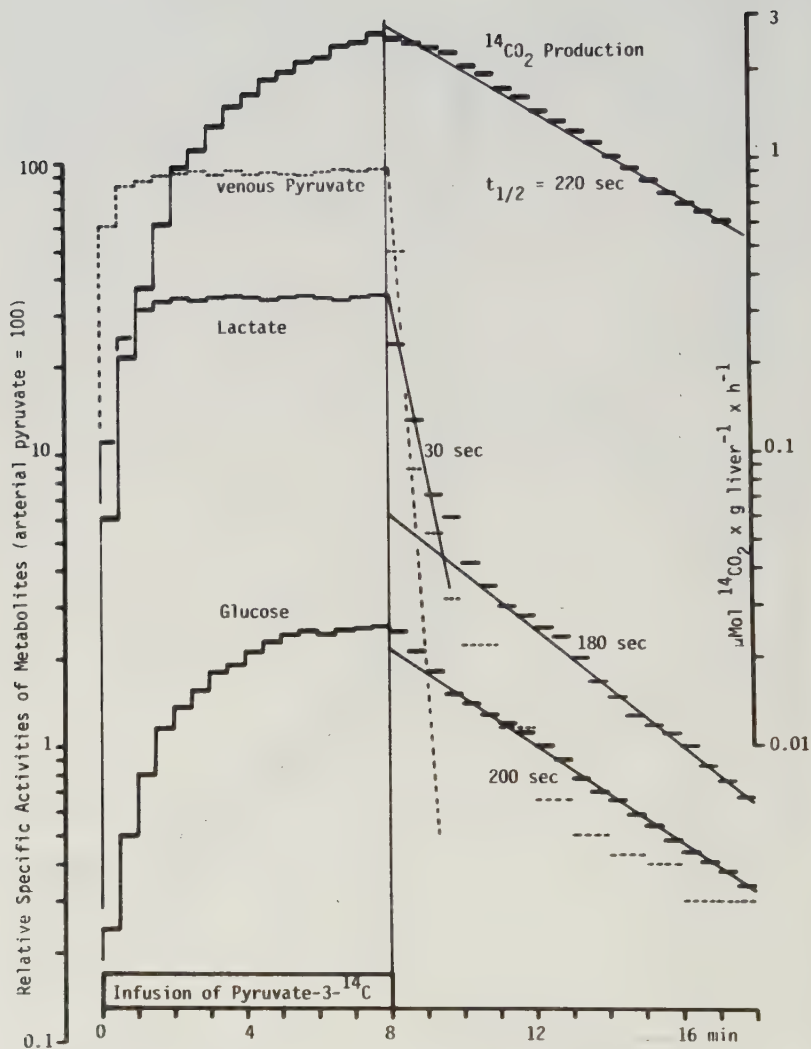


Abb. 14 On- und off-Kinetiken nach Infusion von Tracermengen an Pyruvat-3- ^{14}C in Anwesenheit von 0,4 mM Pyruvat. Linke Ordinate: relative spezifische Aktivitäten von Glucose, Lactat und venösem Pyruvat, arterielles Pyruvat = 1, im logarithmischen Maßstab; rechte Ordinate: $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{Mol } ^{14}\text{CO}_2 \times \text{g Leber}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bezogen auf die spezifische Aktivität des arteriellen Pyruvats, im logarithmischen Maßstab. Abszisse: Zeit in min.

läßt deutlich zwei Abschnitte erkennen, wobei das anfängliche schnelle Absinken der spezifischen Aktivitäten Halbwertszeiten von 18 bzw. 24 sec, das anschließende langsamere Absinken Halbwertszeiten von 160 bzw. 200 sec haben. Der schnelle Anteil der Abklingkinetik ($T/2$ ca. 20 sec) tritt beim Lactat stärker in Erscheinung als bei der Glucose.

3.1.3.2. Off-Kinetiken nach Pyruvat-3- ^{14}C Infusion

In Abb. 14 ist ein Experiment beschrieben, in dem in Anwesenheit von 0,4 mM Pyruvat für die Dauer von 8 Minuten Tracermengen von Pyruvat-3- ^{14}C infundiert wurden. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion und die relativen spezifischen Aktivitäten von Glucose, Lactat und Pyruvat im venösen Perfusat (bezogen auf die spezifische Aktivität des arteriellen Pyruvats) sind im logarithmischen Maßstab aufgetragen. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion und die spezifische Aktivität der Glucose steigen nach Einsetzen der Infusion langsam an, während die spezifischen Aktivitäten des venösen Pyruvats und des Lactats bereits nach 1 bis 2 Minuten einen Endwert erreichen. Die spezifischen Aktivitäten für Pyruvat, Lactat und Glucose betragen nach 8-minütiger Infusion 100, 35 und 2,5 Prozent der Aktivität des arteriellen Pyruvats.

Nach Absetzen der Infusion sinken die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion und die spezifische Aktivität der Glucose langsam ab. Die Halbwertszeiten betragen 220 bzw. 200 Sekunden. Dagegen zeigt die Abklingkinetik des Lactats zunächst einen schnellen und dann einen langsamen Abschnitt in ähnlicher Weise wie es bei der Abklingkinetik nach Pyruvat-1- ^{14}C Infusion beobachtet wird. Die Halbwertszeiten der beiden Kinetiken betragen 30 bzw. 180 Sekunden.

3.1.3.3. Auswaschkinetik der Radioaktivität aus dem Perfusionssystem

Die beschriebenen off-Kinetiken spiegeln allerdings nicht nur zelluläre Prozesse wider, sondern auch das Auswaschen des radioaktiven Tracers aus dem Perfusionssystem. Die Frage ist, inwieweit diese systembedingte Kinetik die durch den Zellstoffwechsel bedingten Kinetiken beeinflusst bzw. ihre Aussage beeinträchtigt. Das Auswaschen der Radioaktivität aus der Perfusionsapparatur wurde mit direkt verbundenen Zu- und Abflußkanülen (d. h. ohne Leber) gemessen. Die off-Kinetik ist in Abb. 15 zusammen mit den Kinetiken der zellulären Parameter in einem Perfusionsexperiment aufgetragen. Die Auswaschkinetik des Tracers (Abb. 15: „arterial Pyruvate“) verläuft äußerst steil. Ihre Halbwertszeit von 2 sec ist deutlich kleiner als die Halbwertszeit der schnell-

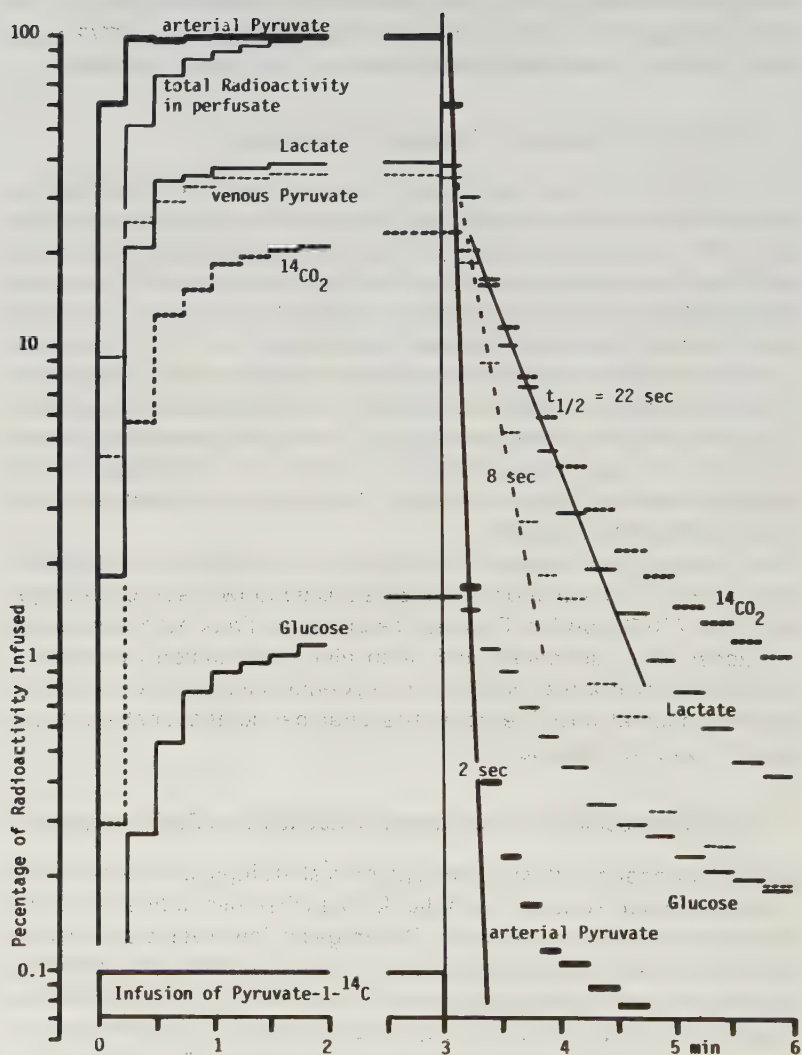


Abb. 15 Die Auswaschkurve der Radioaktivität aus dem Perfusionssystem zusammen mit den Auswaschkurven der zellulären Parameter nach Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C in Tracer-mengen (Experiment wie in Abb. 13). Ordinate: Prozent der infundierten Radioaktivität im logarithmischen Maßstab; Abszisse: Zeit in min.

sten Kinetik eines zellulären Parameters (18 sec). Es ist deshalb ausgeschlossen, daß die systembedingte Auswaschkinetik die Analyse der zellulären Parameter wesentlich beeinträchtigt.

3.1.3.4. Vergleich der off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C

Die off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C unterscheiden sich deutlich, wie in den Abb. 16, 17 und 18 zu erkennen ist. Bei Infusion gleicher Mengen an Radioaktivität in Form von Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C erreicht die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C einen Endwert, der um eine Größenordnung höher ist als derjenige der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-3- ^{14}C (Abb. 16, 17). Der Maximalwert der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion ist bei Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C bereits nach drei Infusionsminuten erreicht; bei Infusion von Pyruvat-3- ^{14}C steigt die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion langsamer an und erreicht auch nach acht Minuten noch keinen Maximalwert (Abb. 16, 17, 18). Die Auswaschphase zeigt charakteristische Unterschiede. Die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C fällt unmittelbar nach Infusionsende mit einer Halbwertszeit von 20 bis 30 Sekunden (Abb. 16, 17, 18) steil ab, bis sie ungefähr einen Wert erreicht hat, der dem Maximalwert der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-3- ^{14}C entspricht (Abb. 16, 17). Von dann ab verläuft die Auswaschkurve parallel zu der entsprechenden Kurve mit Pyruvat-3- ^{14}C , bei der eine schnelle Kinetik nicht zu erkennen ist. Die Halbwertszeit dieser langsamen Auswaschkinetik von Pyruvat-3- ^{14}C und Pyruvat-1- ^{14}C liegt zwischen drei und sechs Minuten.

3.1.3.5. Unterscheidung der PDH-abhängigen und PDH-unabhängigen Anteile der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion

Die Auswaschkurve der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion nach Infusion von Pyruvat-1- ^{14}C enthält eine schnelle Kinetik, die nicht in der entsprechenden Kurve mit Pyruvat-3- ^{14}C erscheint, während eine langsame Kinetik mit beiden Tracern beobachtet wird. Für die langsamere Kinetik kommen Prozesse infrage, in denen die Kohlenstoffatome C 1 und C 3 des Pyruvats in gleicher Weise decarboxyliert werden können. Das ist in erster Linie der Citratcyclus, in den die Kohlenstoffatome des Pyruvats entweder als Acetyl-CoA oder als Oxalacetat einfließen. Die schnelle Kinetik, die nur nach Pyruvat-1- ^{14}C Infusion auftritt, entspricht dagegen der direkten Decarboxylierung der Carboxylgruppe des Pyruvats. Infrage kommt die durch den PDH-Komplex katalysierte Reaktion.

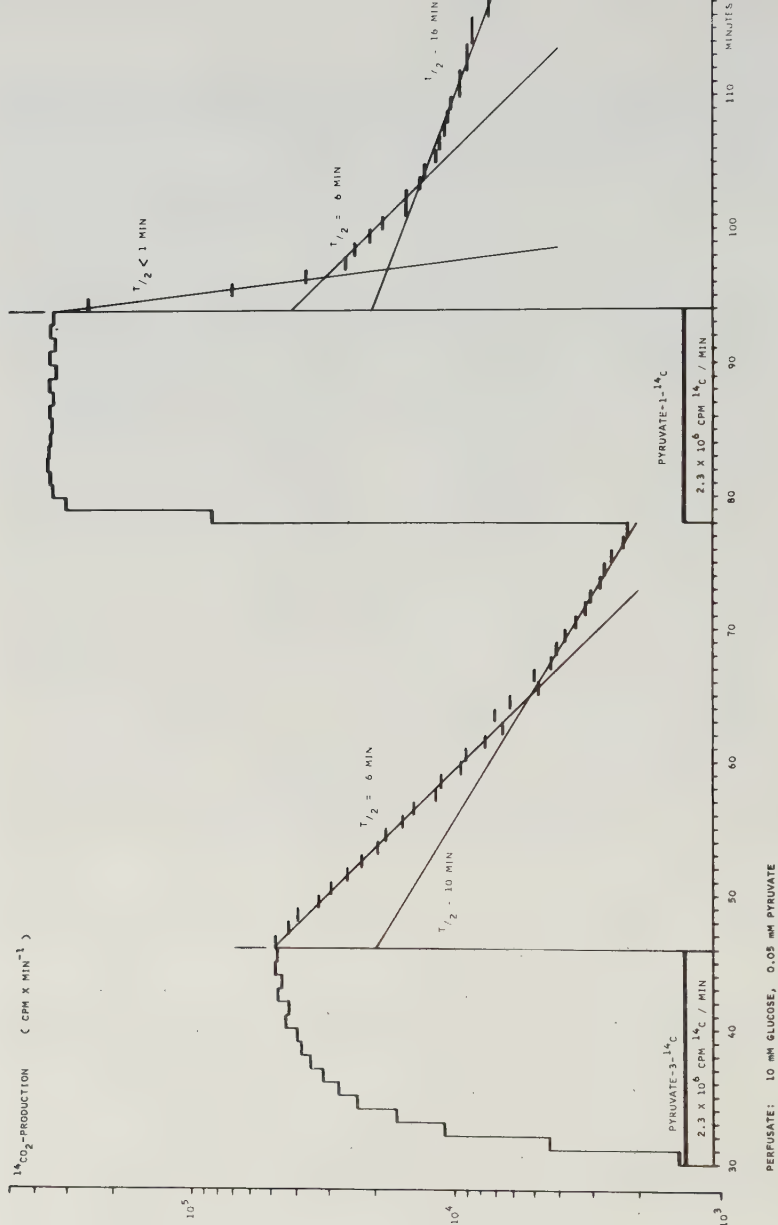


Abb. 16 Vergleich der on- und off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C nach aufeinanderfolgenden Tracerinfusionen. Das Perfusat enthielt 10 mM Glucose und 0,05 mM Pyruvat. Ordinate: cpm der in 1-Minuten-Fractionen ausgetriebenen CO_2 -Menge im logarithmischen Maßstab. Es wurden gleiche Mengen an Radioaktivität infundiert. Abszisse: Zeit in min.

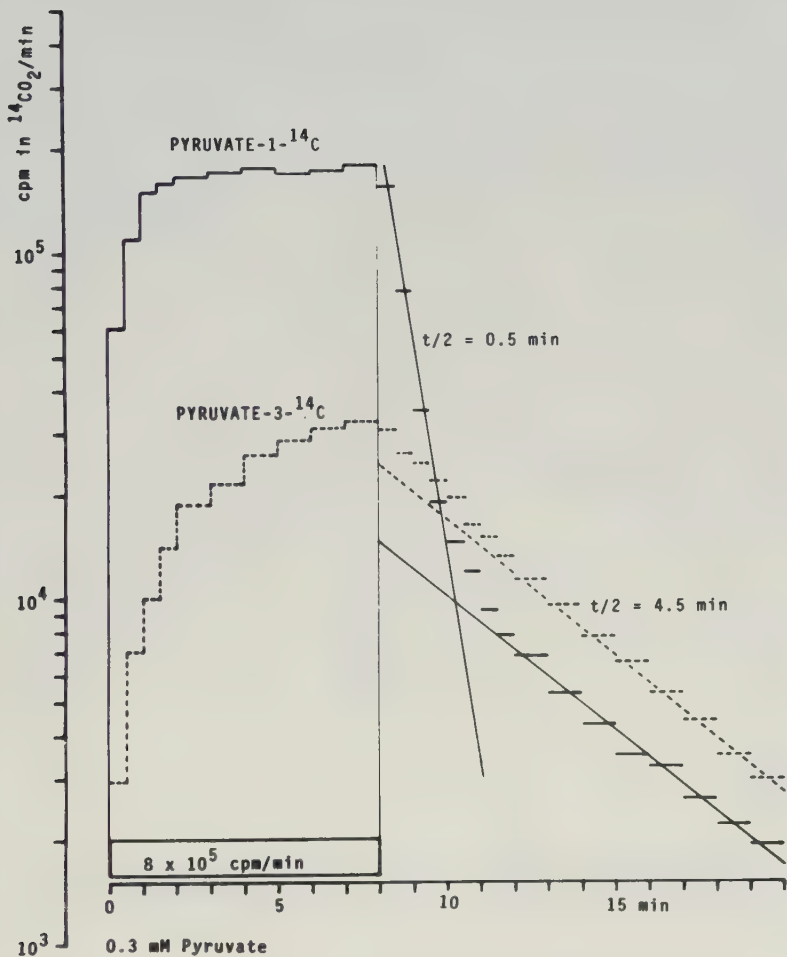


Abb. 17 Vergleich der on- und off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C nach aufeinanderfolgenden Tracerinfusionen. Das Perfusat enthielt 0,3 mM Pyruvat. Ordinate: cpm der in 1-Minuten-Fractionen ausgetriebenen CO_2 Menge im logarithmischen Maßstab. Es wurden gleiche Mengen an Radioaktivität infundiert. Abszisse: Zeit in min.

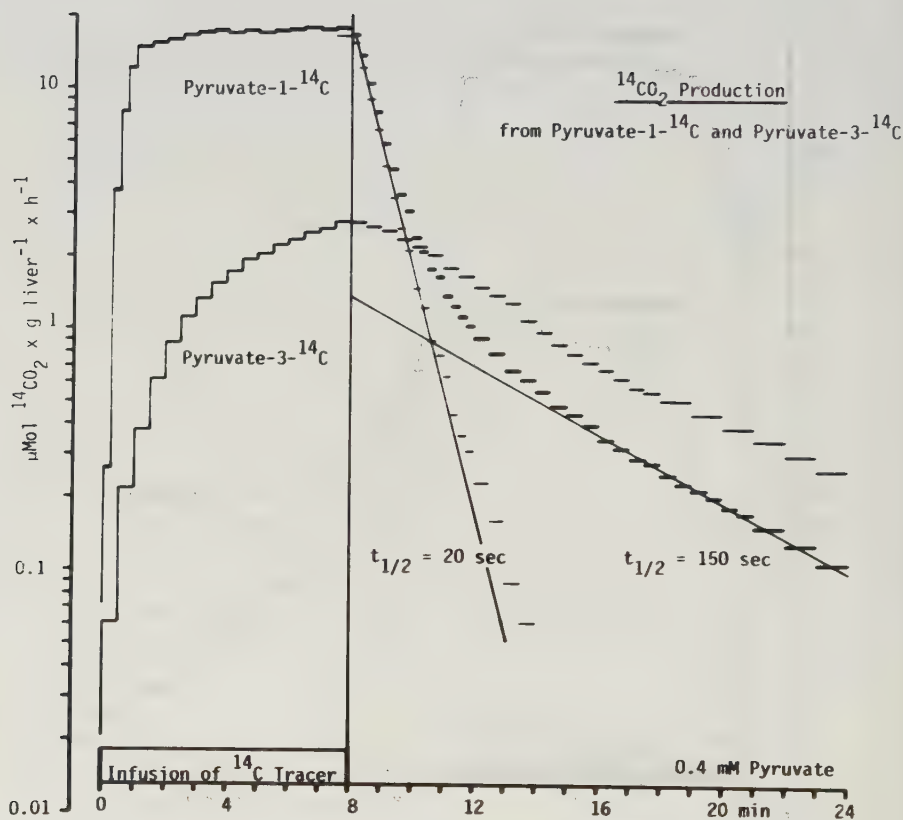


Abb. 18 Vergleich der on- und off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C und Pyruvat-3- ^{14}C nach aufeinanderfolgenden Tracerinfusionen. Das Perfusat enthielt 0,4 mM Pyruvat. Ordinate: $^{14}\text{CO}_2$ -Produktionsgeschwindigkeit in $\mu\text{Mol } ^{14}\text{CO}_2 \times \text{g Leber}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bezogen auf die spezifische Aktivität des arteriellen Pyruvats, im logarithmischen Maßstab. Abszisse: Zeit in min.

POOLS OF RADIOACTIVE PRECURSORS FOR $^{14}\text{CO}_2$ PRODUCTION FROM PYRUVATE-1- ^{14}C

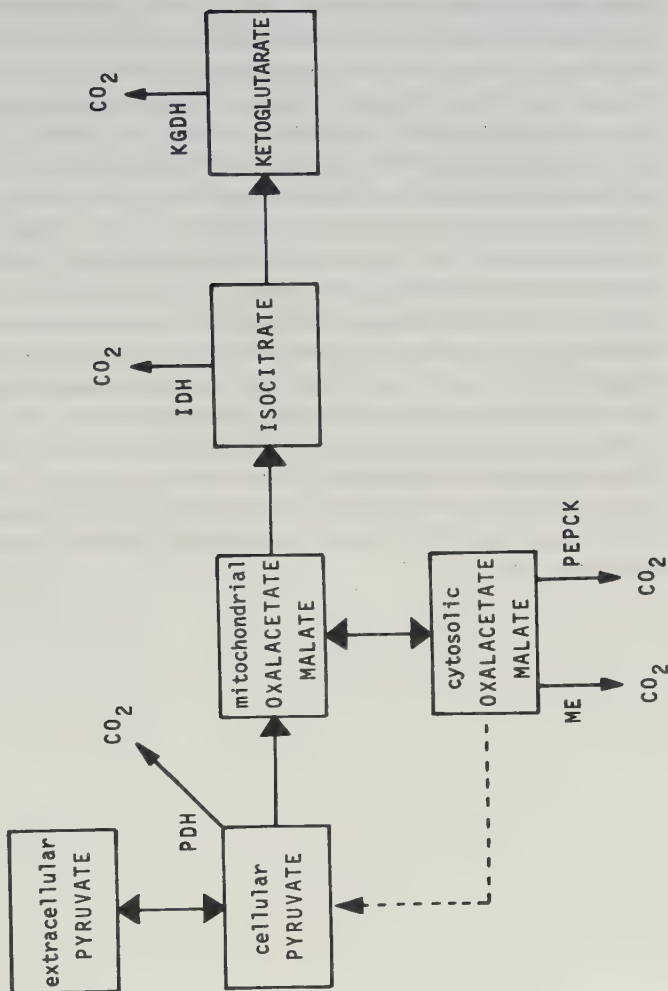


Abb. 19 Blockdiagramm zur Darstellung der verschiedenen Pools an radioaktiven Praekursoren für die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion sowie ihrer Sequenz.

Die off-Kinetik der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion nach Pyruvat-1- ^{14}C Infusion kann als das Auswaschen der Radioaktivität aus mehreren zellulären Pools von Praekursoren beschrieben werden. Abb. 19 soll diese Beziehungen veranschaulichen. Der zelluläre Pyruvat-Pool wird aufgefüllt

durch das extrazelluläre Pyruvat. Seine Radioaktivität wird als CO_2 (PDH-Reaktion) abgegeben; sie fließt aber auch in den mitochondrialen Oxalacetat-Malat-Pool (Pyruvatcarboxylase-Reaktion). Dieser Pool wiederum liefert das Substrat für weitere Decarboxylierungsreaktionen (IDH- und α -KGDH-, ME- und PEPCK-Reaktion im Cytosol). Wenn nach Absetzen der Pyruvat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ Infusion die Radioaktivität im extrazellulären Pyruvat ausgewaschen wird, entleert sich zuerst die Radioaktivität aus dem zellulären Pyruvat-Pool, während in den mitochondrialen Oxalacetat-Malat-Pool noch weiterhin Radioaktivität – wenn auch mit verminderter Geschwindigkeit – fließt. Alle Decarboxylierungsreaktionen, die von diesem Oxalacetat-Malat-Pool gespeist werden, müssen deshalb eine langsamere Auswaschkinetik zeigen als die direkte Decarboxylierung des Pyruvat-Pools. Der Schluß ist deshalb gerechtfertigt, daß die schnelle Kinetik die PDH-Reaktion, die langsameren Kinetiken dagegen die übrigen, vom Oxalacetat abhängigen Decarboxylierungsreaktionen widerspiegeln. Es ist deshalb möglich, durch Extrapolation der langsamen Kinetik auf den Endpunkt der Tracer-Infusion von der gesamten $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion den nicht PDH-abhängigen Anteil zu subtrahieren.

3.2. Anwendung der Pyruvat-1-¹⁴C-Methode zur Bestimmung der Geschwindigkeit der PDH-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen der perfundierten Leber

3.2.1. Abhängigkeit von der extrazellulären Pyruvatkonzentration

Abb. 6 (siehe Abschnitt 2.1.7.) zeigt ein Perfusionsexperiment, in dem die Pyruvatkonzentration stufenweise von 0,2 bis 1,9 mM Pyruvat durch Variation der Infusionsgeschwindigkeit erhöht wurde. Die Registrierung der venösen Sauerstoffkonzentration zeigt einen entsprechenden

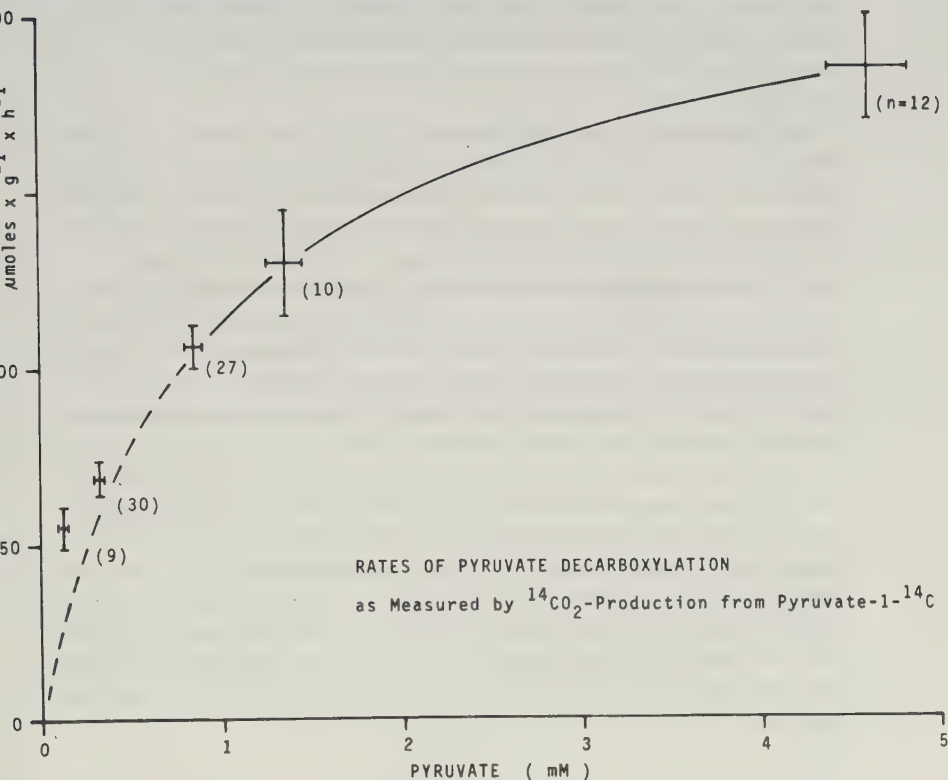


Abb. 20 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung (Ordinate) von der extrazellulären Pyruvatkonzentration (Abszisse). Das Diagramm ist eine Zusammenfassung von 88 Einzelwerten aus insgesamt 30 Perfusionsexperimenten. Die horizontalen Balken entsprechen den Standardabweichungen der Mittelwerte der Pyruvatkonzentrationen im Perfusat (arithmetisches Mittel der arteriellen und venösen Pyruvatkonzentrationen); die vertikalen Balken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte der Decarboxylierungsgeschwindigkeit dar. Die Anzahl der Werte, die für einen bestimmten Konzentrationsbereich zusammengefaßt wurden, sind in Klammern angegeben.

schrittweisen Anstieg in der Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs. Wenn die Sauerstoffregistrierung die Einstellung eines neuen steady state anzeigte, wurden Tracermengen von Pyruvat-1- ^{14}C für die Dauer von 8 Minuten infundiert. Die Abbildung zeigt die on- und off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion sowie die Korrektur für nicht PDH-abhängige Prozesse. In der Abbildung ist weiterhin die relative spezifische Aktivität des Lactats angegeben, die am Ende der jeweiligen Infusionsphase im Perfusat gemessen wurde (siehe Zahlen im oberen Teil der Abbildung) sowie die daraus und aus der korrigierten $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion berechneten Geschwindigkeiten der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats. Diese Werte stiegen von 57 auf $134 \mu\text{Mol x g}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ an, wenn die Pyruvatkonzentration von 0,2 auf 1,9 mM erhöht wurde.

Die Ergebnisse einer Versuchsserie mit Experimenten, die einen ähnlichen Versuchsablauf hatten wie das in Abb. 408 beschriebene Experiment, sind in Abb. 20 zusammengefaßt. Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung von der extrazellulären Pyruvatkonzentration (angegeben als das arithmetische Mittel der arteriellen und venösen Pyruvatkonzentration). Für die statistische Auswertung wurden insgesamt 88 Einzelwerte herangezogen. Die Kurve, die durch die Mittelwerte der einzelnen Meßwertpopulationen gelegt wurde, zeigt nur bei den Konzentrationen über 0,8 mM einen exponentiellen Verlauf, während im niedrigen Konzentrationsbereich alle Werte oberhalb dieser angenommenen Exponentialkurve liegen.

Wenn man diese Mittelwerte im doppeltreziproken Maßstab darstellt (Abb. 21), zeigen die Werte mit hohen Pyruvatkonzentrationen eine angenähert lineare Beziehung. Durch Extrapolation auf unendlich hohe Pyruvatkonzentrationen kann man aus dem Ordinatenabschnitt eine maximale Geschwindigkeit („ V_{max} “) von $230 \mu\text{Mol x g}^{-1} \text{ x h}^{-1}$ ablesen. Aus dem Abszissenabschnitt läßt sich für die halbmaximale Geschwindigkeit eine Konzentration („ K_A “) von 0,9 mM Pyruvat berechnen.

3.2.2. Effekt von Dichloracetat auf die oxydative Pyruvatdecarboxylierung

Nach den Arbeiten aus dem Arbeitskreis um Randle [43] ist bekannt, daß Dichloracetat die PDH-Kinase hemmt, woraus ein erhöhter Anteil von aktiver PDH_a an der gesamten PDH resultiert. Diese Wirkung des Dichloracetat kann auch in der isolierten perfundierten Rattenleber

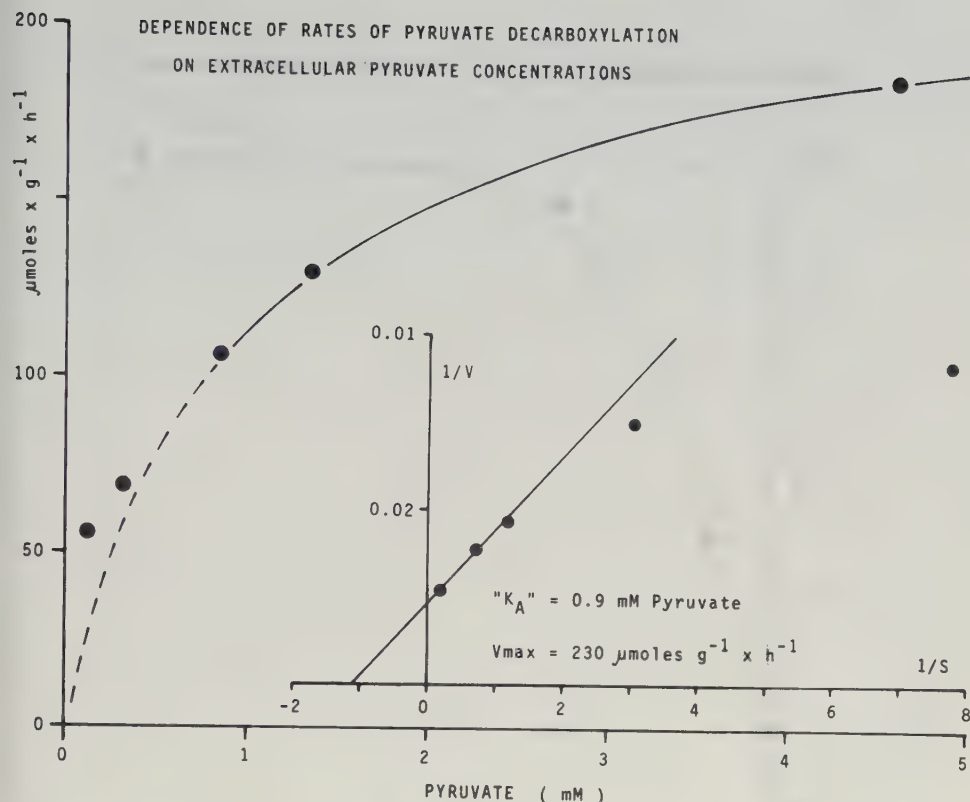


Abb. 21 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung (Ordinate) von der extrazellulären Pyruvatkonzentration (Abszisse). Mittelwerte aus Abb. 419. Das eingeschobene Diagramm zeigt eine Darstellung im doppelt reziproken Maßstab nach Lineweaver-Burk. Durch Extrapolation wurden die maximale Decarboxylierungsgeschwindigkeit und die Konzentration für halbmaximale Geschwindigkeit ermittelt.

beobachtet werden. Abb. 22 zeigt, daß bei Konzentrationen um 0,3 mM Pyruvat die Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung um den Faktor 3 ansteigt. Der Effekt ist nahezu maximal bei Konzentrationen um 1 mM Dichloracetat; die Konzentration für halbmaximalen Effekt liegt unter 0,5 mM Dichloracetat. Die Experimente mit Dichloracetat, die im folgenden beschrieben werden, wurden sämtlich mit einer Dichloracetatkonzentration von 3 mM durchgeführt.

EFFECT OF DICHLORACETATE ON PYRUVATE DECARBOXYLATION

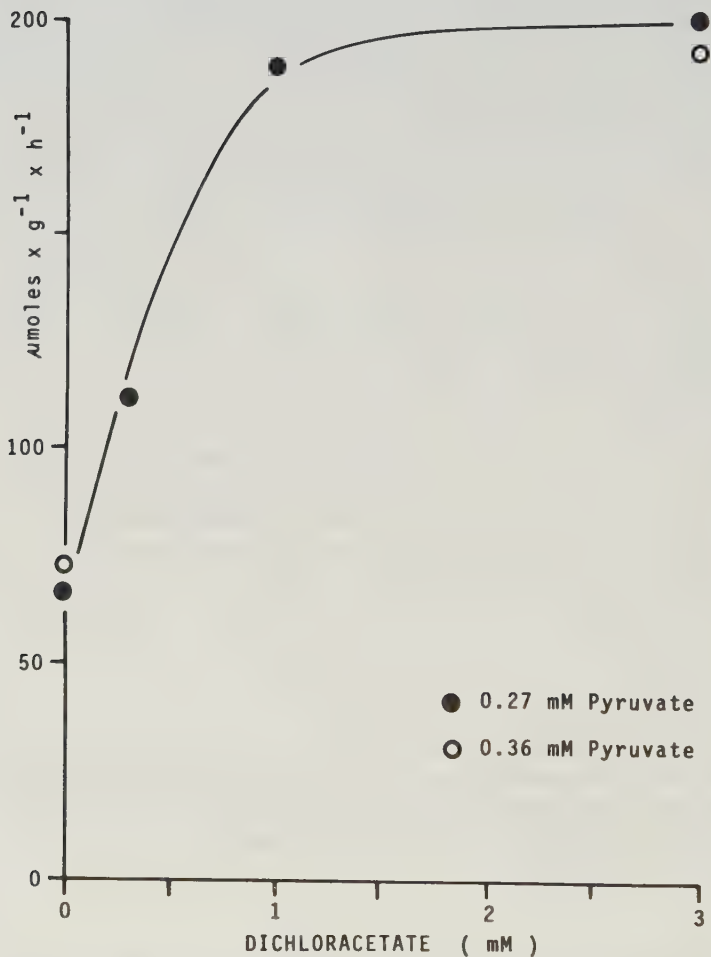


Abb. 22 Einfluß des Dichloracetat auf die Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung (Ordinate). Die Dichloracetatkonzentration wurde im Bereich zwischen 0 und 3 mM variiert (Abszisse). Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei Perfusionsexperimenten mit 0,27 bzw. 0,36 mM Pyruvat im Perfusat.

Wenn Dichloracetat infundiert wird, sinken die venösen Konzentrationen von Pyruvat und Lactat stark ab (Abb. 23). Während vor der Gabe von Dichloracetat mehr C-3 Einheiten im Perfusat erscheinen als durch Pyruvatinfusion zugegeben wurden, so daß ein erheblicher Betrag nur durch den Abbau von Glycogen erklärt werden kann, ist in Anwesenheit von Dichloracetat die Summe der Konzentrationen der C-3 Einheiten geringer als die arterielle Pyruvatkonzentration. Ein verminderter Glycogenabbau ist unwahrscheinlich. Diese Veränderungen sprechen eher für eine erhebliche Steigerung des oxydativen Abbaus von C-3

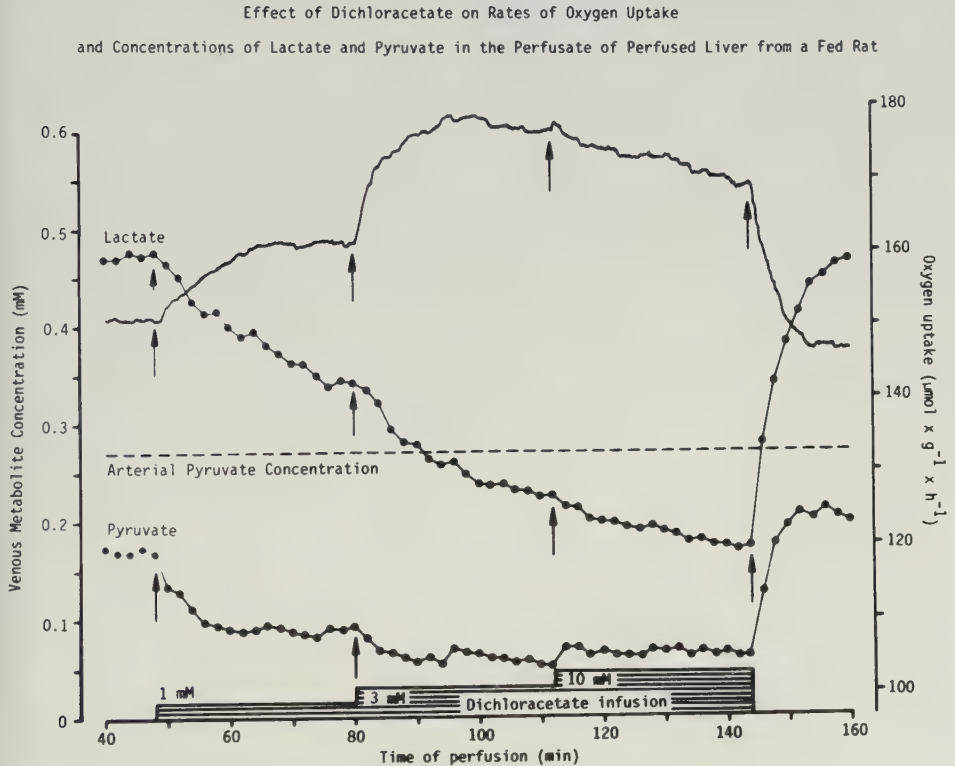


Abb. 23 Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme (rechte Ordinate: $\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) und Konzentrationen von Lactat und Pyruvat (linke Ordinate: mM) im venösen Perfusat der perfundierten Leber einer gefütterten Ratte. Einfluß von Dichloracetat, das in stufenweise steigenden Konzentrationen infundiert wurde. Der Beginn und die Dauer der Infusion sind durch eine Treppenkurve über der Abszisse (Perfusionszeit in Minuten) angedeutet. Die arterielle Pyruvatkonzentration war konstant und ist durch eine unterbrochene Linie angegeben.

Einheiten. Gleichzeitig mit dem Absinken der Pyruvat- und Lactatkonzentrationen steigt der Sauerstoffverbrauch der Leber mit steigenden Dichloracetatkonzentrationen schrittweise an. Im Ausmaß der Veränderungen besteht jedoch eine Diskrepanz; die größten Veränderungen bei Lactat und Pyruvat werden nach Zugabe von 1 mM Dichloracetat

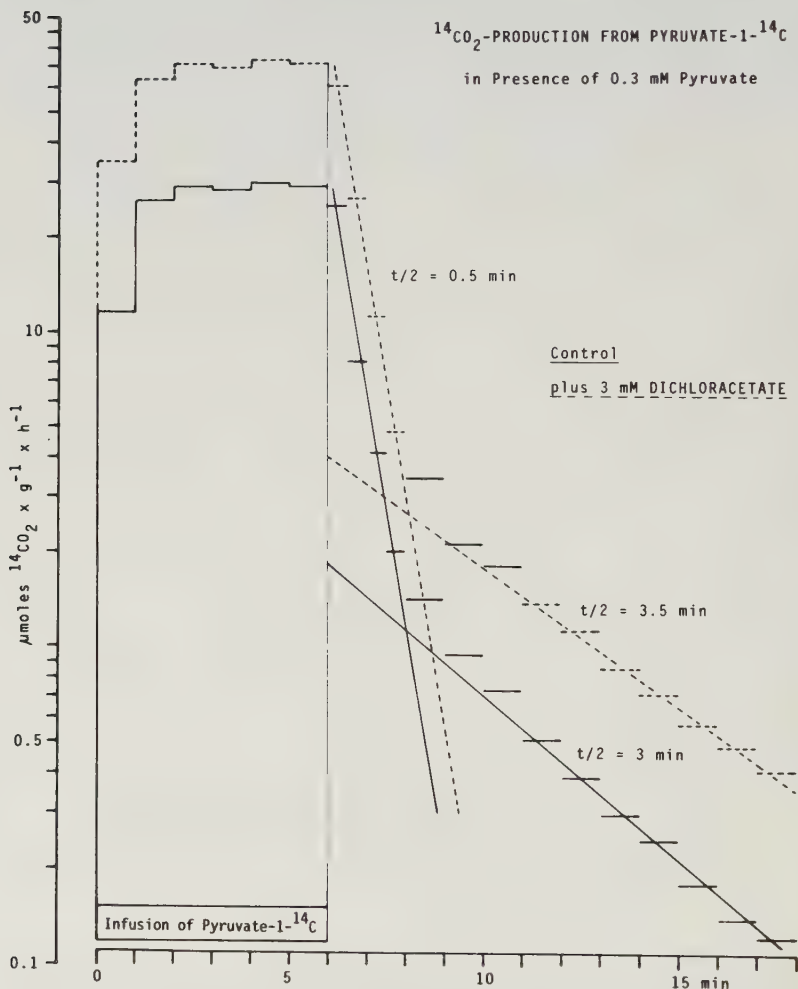


Abb. 24 On- und off-Kinetiken der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C in Abwesenheit (—) und Anwesenheit von 3 mM Dichloracetat (---). Ordinate: Geschwindigkeit der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion in $\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bezogen auf die spezifische Aktivität des arteriellen Pyruvats. Abszisse: Zeit in Minuten.

beobachtet, während die entscheidenden Änderungen im Sauerstoffverbrauch erst nach Zuführung von 3 mM Dichloracetat auftreten. Diese Diskrepanz kann zur Zeit nicht erklärt werden.

Trotz der Steigerung der PDH-Aktivität in Anwesenheit von Dichloracetat auf das Dreifache (bei 0,3 mM Pyruvat) wird die Auswaschkinetik nicht wesentlich verändert. Wie Abb. 24 zeigt, hat die schnelle Kinetik sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Dichloracetat ein $T_{1/2}$ von 0,5 Minuten, während die langsame Kinetik unter beiden Bedingungen ein $T_{1/2}$ von 3 bis 3,5 Minuten zeigt. Zwar sinkt unter der Einwirkung von

RATES OF PYRUVATE DECARBOXYLATION IN PRESENCE OF DICHLORACETATE (3 mM)

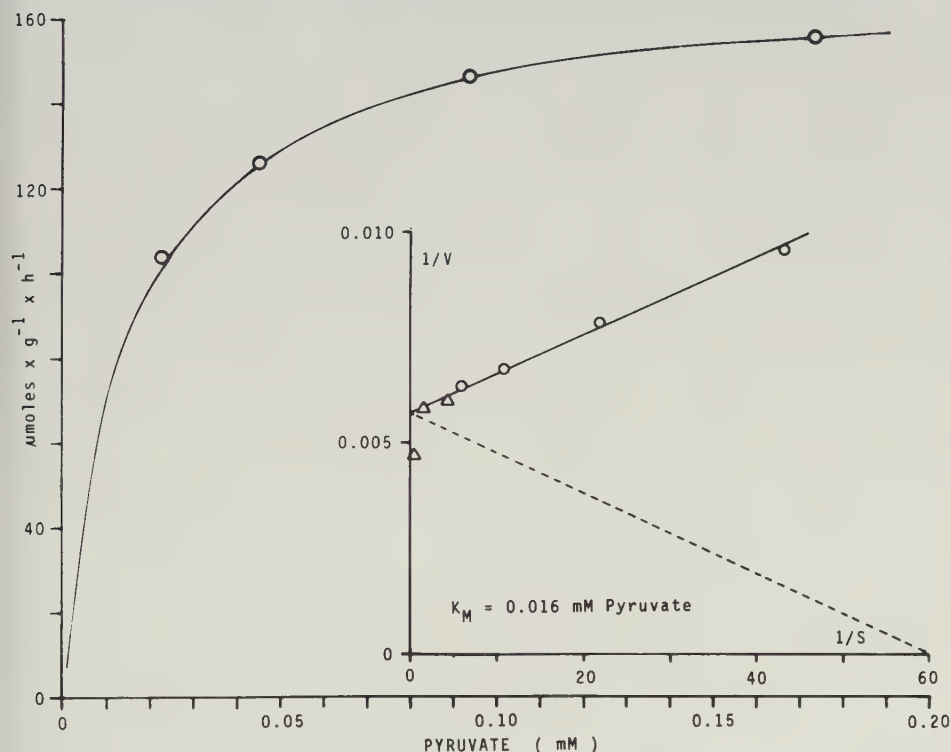


Abb. 25 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung (Ordinate) von der Pyruvatkonzentration im Perfusat (Abszisse: arithmetisches Mittel aus arterieller und venöser Pyruvatkonzentration) in Anwesenheit von Dichloracetat (3 mM). Das eingeschobene Diagramm zeigt eine doppelt-reziproke Auftragung dieser Werte (0-0) sowie von Werten, die bei höheren Pyruvatkonzentrationen in einem anderen Perfusionsexperiment gemessen wurden $\triangle - \triangle$.

Dichloracetat die Pyruvatkonzentration im venösen Perfusat als Ausdruck der gesteigerten oxydativen Pyruvatdecarboxylierung stark ab (Abb. 23), die spezifische Aktivität des venösen Lactats ist jedoch nicht wesentlich verändert. Die Steigerung der Decarboxylierungsgeschwindigkeit geht deshalb ausschließlich zu Lasten der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion.

Abb. 25 zeigt die Abhängigkeit der Decarboxylierungsgeschwindigkeit von niedrigen Pyruvatkonzentrationen (0,02–0,2 mM) in Anwesenheit von Dichloracetat. Die Werte folgen einer Exponentialfunktion im Sinne einer Michaelis-Menten-Kinetik, was auch durch die lineare Beziehung im doppelt reziproken Plot bestätigt wird. Die Konzentration für halbmaximale Geschwindigkeit (K_M) liegt jetzt bei 0,016 mM.

RATES OF PYRUVATE DECARBOXYLATION IN PERFUSED RAT LIVER

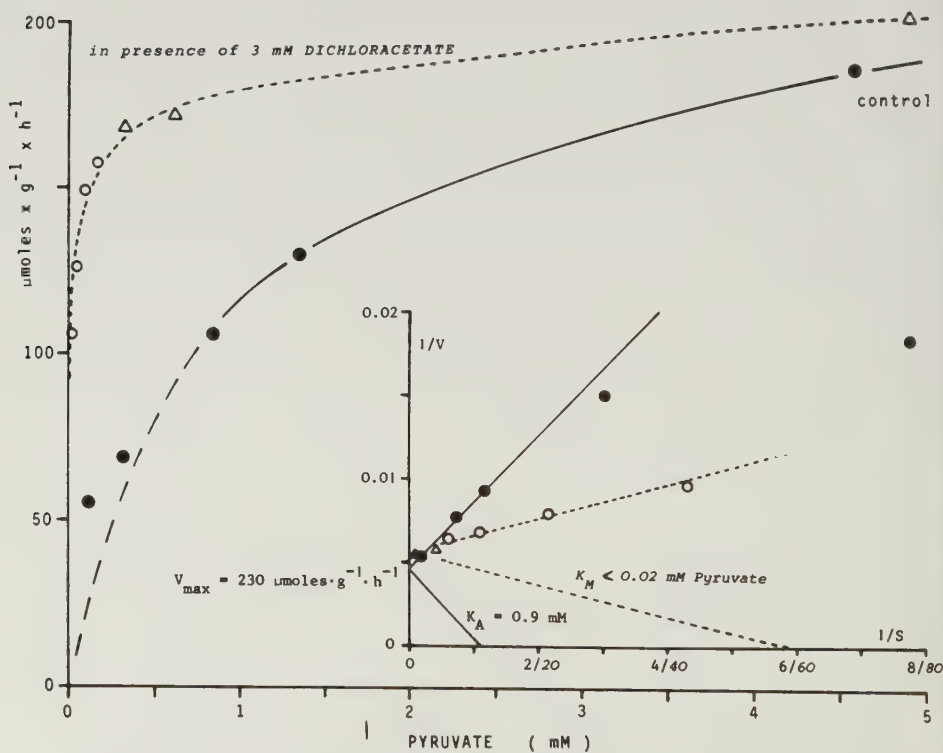


Abb. 26 Abhängigkeit der Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung (Ordinate) von der extrazellulären Pyruvatkonzentration (Abszisse) ohne (●) und mit 3 mM Dichloracetat (○, △). Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse in Abb. 20, 21 und 25.

Die Ergebnisse der Pyruvattitrationen in An- und Abwesenheit von Dichloracetat sind in Abb. 26 zusammengefaßt. Es ist zu erkennen, daß in Anwesenheit des Hemmstoffes der PDH-Kinase die maximale Decarboxylierungsgeschwindigkeit bereits bei Pyruvatkonzentrationen von 0,2 mM nahezu erreicht ist, während in Abwesenheit von Dichloracetat auch bei 5 mM Pyruvat noch keine Sättigung zu erkennen ist. Die unterschiedlichen Konzentrationen für halbmaximale Geschwindigkeit (0,02 mM mit Dichloracetat, 0,9 mM ohne Dichloracetat) spiegeln offensichtlich zwei unterschiedliche Prozesse wider: Der Wert von 0,02 mM entspricht möglicherweise der Michaelis-Menten-Konstanten der aktiven PDH und ist damit ein Maß für die Affinität des Enzyms zu Pyruvat als Substrat. Dagegen spiegelt möglicherweise der Wert von 0,9 mM die Wechselwirkung des Multienzymkomplexes mit Pyruvat als Aktivator wider. Dieser Wert läßt sich deshalb als Inhibitorkonstante der PDH-Kinase beschreiben.

3.2.3. Temperaturabhängigkeit der PDH-Reaktion

In mehreren Perfusionsexperimenten wurde die Temperatur des Perfusats schrittweise von 37° C bis auf 5° C gesenkt. Auf jedem Temperaturplateau wurde die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion in Anwesenheit von 5 mM Pyruvat gemessen. Bei dieser Pyruvatkonzentration war aufgrund der vorausgegangenen Titrationsen eine Aktivität von ungefähr 90% der maximalen Geschwindigkeit zu erwarten. Da die maximale Geschwindigkeit einer Reaktion proportional der Geschwindigkeitskonstanten ist, wurden diese Werte benutzt, um die Aktivierungsenergie der PDH-Reaktion graphisch zu ermitteln.

Die Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung bei verschiedenen Temperaturen wurden im logarithmischen Maßstab gegen den reziproken Wert der absoluten Temperatur aufgetragen. Abb. 27, welche die Ergebnisse von zwei gleichartigen Experimenten zeigt, läßt erkennen, daß eine lineare Beziehung zwischen $\log V$ und $1/T$ im Bereich zwischen 37° C und 10° C besteht. Daraus läßt sich ein Q_{10} von 3,2 ermitteln, d. h. bei einer Temperaturänderung um 10° C ändert sich die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 3,2. Entsprechend der von Arrhenius aufgestellten Gleichung läßt sich mit Hilfe der Steigung in diesem Diagramm die Aktivierungsenergie

$E = R \times \frac{\ln K}{1/T}$ bzw. $E = R \times 2,3 \times \frac{\log V}{1/T}$ ermitteln. Das Diagramm in Abb. 27 ergibt für die oxydative Decarboxylierung des Pyruvats unter

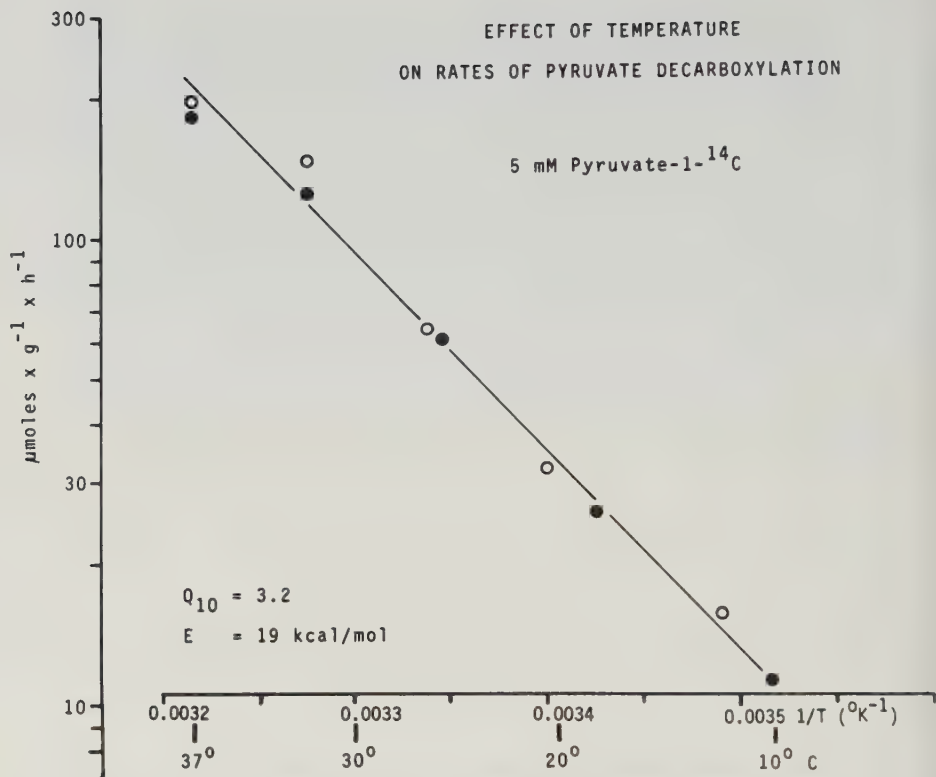


Abb. 27 Temperaturabhängigkeit der PDH-Reaktion, dargestellt in einem sog. Arrhenius-Diagramm. Ordinate: Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung ($\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$) im logarithmischen Maßstab. Abszisse: Reziprokwerte der absoluten Temperatur ($^{\circ}\text{K}^{-1}$). Berechnung der Aktivierungsenergie siehe Text.

den Bedingungen der perfundierten Rattenleber eine Aktivierungsenergie von 19 kcal/Mol. bzw. 80 kJoule/Mol.

Die Gewebsaktivität der PDH wird üblicherweise bei 25° C gemessen. Um die von uns bei 37° C gemessenen Flußgeschwindigkeiten mit den in der Literatur angegebenen Aktivitäten zu vergleichen, ist eine Umrechnung auf 25° C erforderlich. Einer maximalen Flußgeschwindigkeit von 230 $\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bei 37° C entspricht aufgrund eines Q_{10} von 3,2 eine Aktivität von 64 $\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ bei 25° C. Das sind 1,1 Units pro g Leber. Dieser Wert steht in guter Übereinstimmung mit den Befunden an Leberhomogenaten. Die in der Literatur angegebenen Werte schwanken zwischen 0,6 und 1,1 U pro g Leber [20, 22, 23, 24, 25, 27, 43].

3.2.4. Abhängigkeit der PDH-Reaktion von extrazellulären Zuckerkonzentrationen

Eine Aufgabe der Leber ist, bei erhöhten Zuckerkonzentrationen im Pfortaderblut Glucose nicht nur als Glycogen zu speichern, sondern auch in Fett umzuwandeln. Die Fettsäuresynthese aus Kohlenhydraten erfordert aber zunächst einen glycolytischen Abbau der Zuckerphosphate in Pyruvat und die anschließende oxydative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA. Es war deshalb die Frage, ob die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion in Anwesenheit von hohen Zuckerkonzentrationen im Perfusat gesteigert wird.

Der Einfluß verschiedener Konzentrationen von Glucose und Fructose auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung wurde in Versuchen gemessen, die ähnlich dem in Abb. 6 dargestellten Experiment aufgebaut waren. Bei konstanten Pyruvatkonzentrationen (0,3 mM bzw. 1,2 mM) wurden Glucose oder Fructose mit stufenweise steigenden Konzentrationen infundiert. Die Ergebnisse zeigen keinen eindeutigen Einfluß dieser beiden Zucker auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung (Tab. 3 und 4). Eine geringfügige Steigerung, die in Anwesenheit von 12 mM Fructose beobachtet wird, läßt sich durch die leicht erhöhte Pyruvatkonzentration erklären. Eine Steigerung der PDH-Aktivität, wie sie von anderen Autoren in der Rattenleber

Tab. 3 Wirkung von Glucose auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung

Glucose mM	art.	Pyruvat mM ven.	$\frac{1}{2} (a + v)$	CO ₂ -Produktion $\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$
0	0,29	0,26	0,28	77
4	0,29	0,23	0,26	72
10	0,29	0,26	0,28	67
34	0,29	0,34	0,32	68
0	1,12	0,69	0,87	91
4	1,12	0,60	0,82	103
9	1,12	0,65	0,85	100
30	1,12	0,74	0,89	114
4	1,12	0,67	0,86	111

Tab. 4 Wirkung von Fructose
auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung

FRUCTOSE mM	PYRUVAT mM			CO ₂ -Produktion μMol x g ⁻¹ x h ⁻¹
	art.	ven.	$\frac{1}{2} (a + v)$	
0	0,28	0,27	0,27	58
12	0,28	0,44	0,36	66
0	0,56	0,35	0,45	79

nach Fructosegabe in vivo beschrieben und die mit einem veränderten ATP/ADP Verhältnis erklärt wurden [22], konnten in diesen Perfusions-experimenten nicht bestätigt werden.

Offensichtlich haben die extrazellulären Zuckerkonzentrationen keinen direkten Einfluß auf die Regulation der PDH-Reaktion. Auch scheinen die Stoffwechselveränderungen, die in der Leber durch Zuckergabe ausgelöst werden, d.h. Veränderungen von zellulären Metabolit- und Coenzymkonzentrationen, die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion nicht zu beeinflussen. Es muß deshalb angenommen werden, daß für eine gesteigerte Pyruvatoxydation als Folge einer erhöhten Kohlenhydratzufuhr Faktoren beteiligt sind, welche die Komplexität des Gesamtorganismus erfordern. Dieses Problem kann deshalb wahrscheinlich nicht am Modell der perfundierten Leber gelöst werden, sondern erfordert in vivo Experimente.

3.2.5. Abhängigkeit der PDH-Reaktion vom Redoxpotential des NAD⁺-Systems

Bei der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats ist NAD⁺ ein Co-Substrat und NADH ein Produkt. Es ist deshalb zu erwarten, daß Änderungen im Redoxpotential des mitochondrialen NAD⁺-Systems auch zu einer Änderung der Flußgeschwindigkeit durch die PDH-Reaktion führen. Es ist jedoch eine offene Frage, inwieweit die in der Zelle möglichen Redoxänderungen tatsächlich die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion beeinflussen können.

Das mitochondriale NAD⁺-System steht über die β-Hydroxybutyrat-dehydrogenase mit den Ketonkörpern Acetoacetat und β-Hydroxybutyrat in Verbindung. Durch Infusion von Acetoacetat in hohen Konzentra-

tionen kann deshalb das NAD^+ -System oxydiert werden, während die Infusion von β -Hydroxybutyrat eine Reduktion dieses Systems bewirken sollte. Die Infusion dieser Ketonkörper in Konzentrationen von jeweils 3 mM hatte keinen deutlichen Effekt auf die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion (Tab. 5). Aufgrund der Beobachtung, daß aus dem infundierten Acetoacetat β -Hydroxybutyrat und umgekehrt gebildet wurde, kann man annehmen, daß unter diesen Bedingungen die Ketonkörper tatsächlich das mitochondriale NAD^+ -System beeinflußt haben. Jedoch scheinen die Redoxänderungen auch unter diesen extremen Bedingungen nicht auszureichen, um die PDH-Reaktion entweder durch ein vermehrtes Angebot von NAD^+ zu stimulieren oder durch eine gesteigerte Konzentration von NADH zu hemmen.

Tab. 5 Wirkung von Ketonkörpern auf die Pyruvatdecarboxylierung

	$\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$
Kontrolle (1,2 mM Pyruvat)	109
plus ACETOACETAT (3 mM)	110
Kontrolle (1,2 mM Pyruvat)	108
plus β -HYDROXYBUTYRAT (3 mM)	99

Die Alkoholoxydation in der Leber führt zu einer starken Negativierung des Redoxpotentials im cytosolischen NAD^+ -System, das sich u. a. in einer Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses Lactat/Pyruvat zuungunsten des Pyruvats äußert. Die Pyruvatkonzentration sowohl in der Zelle als auch im Perfusat sinken drastisch ab (Literatur siehe bei [34]). Diese cytosolischen Redoxänderungen schlagen auch – allerdings in abgeschwächtem Maße – auf das mitochondriale NAD^+ -System durch [44] und könnten deshalb indirekt auch die PDH-Reaktion beeinflussen.

In Anwesenheit von Äthanol (1,6 mM) war die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung deutlich vermindert. Die Hemmung betrug bei einer Pyruvatkonzentration von 0,1 mM ca. 60%; bei 1 mM Pyruvat war die Hemmung dagegen nur ca. 30% (Tab. 6). Diese Änderungen sind jedoch wahrscheinlich nicht durch mitochondriale Redoxänderungen bedingt, sondern werden durch die verminderte Pyruvatkon-

Tab. 6 Wirkung von Äthanol
auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung

Äthanol mM	Pyruvat mM			CO ₂ -Produktion μMol x g ⁻¹ x h ⁻¹	% Hemmung
	art.	ven.	$\frac{1}{2} (a + v)$		
0	0,13	0,14	0,14	65	0
1,6	0,13	0,01	0,07	25	61
0	0,29	0,26	0,28	72	0
1,6	0,29	0,02	0,16	46	36
0	1,07	0,70	0,89	108	0
1,6	1,07	0,21	0,64	77	29

zentration als Folge der cytosolischen Redoxänderungen verursacht. Wenn man die Geschwindigkeit der Decarboxylierung des Pyruvats gegen das arithmetische Mittel der arteriellen und venösen Pyruvatkonzentration aufträgt, so lassen sich sowohl die Kontrollwerte als auch die unter Äthanoleinfluß entstandenen Werte in eine gemeinsame Dosis-Wirkungs-Kurve einfügen (Abb. 28). Der Schluß ist deshalb berechtigt, daß in Anwesenheit von Äthanol die PDH-Reaktion infolge von Substratmangel verlangsamt ist.

3.2.6. Abhängigkeit der PDH-Reaktion vom energetischen Zustand

Um den energetischen Zustand der Leberzellen zu ändern, wurde Dinitrophenol infundiert. Dinitrophenol wirkt als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung. Es verhindert die Bildung von ATP, während der Elektronenfluß durch die entkoppelte Atmungskette gesteigert ist. Die Folge ist eine verstärkte Oxydation der mitochondrialen Flavin- und Pyridinnukleotide. Nach Infusion von Dinitrophenol kommt es zu einer erheblichen Steigerung des Sauerstoffverbrauchs (Abb. 29). Dieser Effekt ist bereits bei Konzentrationen von 0,04 mM Dinitrophenol maximal. Die PDH-Reaktion erreicht bereits bei einer Pyruvatkonzentration von 0,09 mM eine Geschwindigkeit von 251 μMol x g⁻¹ x h⁻¹, was einer Steigerung um mehr als 400% entspricht. Diese Flußgeschwindigkeit

RATES OF PYRUVATE DECARBOXYLATION
IN PRESENCE (●) AND ABSENCE (○) OF ETHANOL

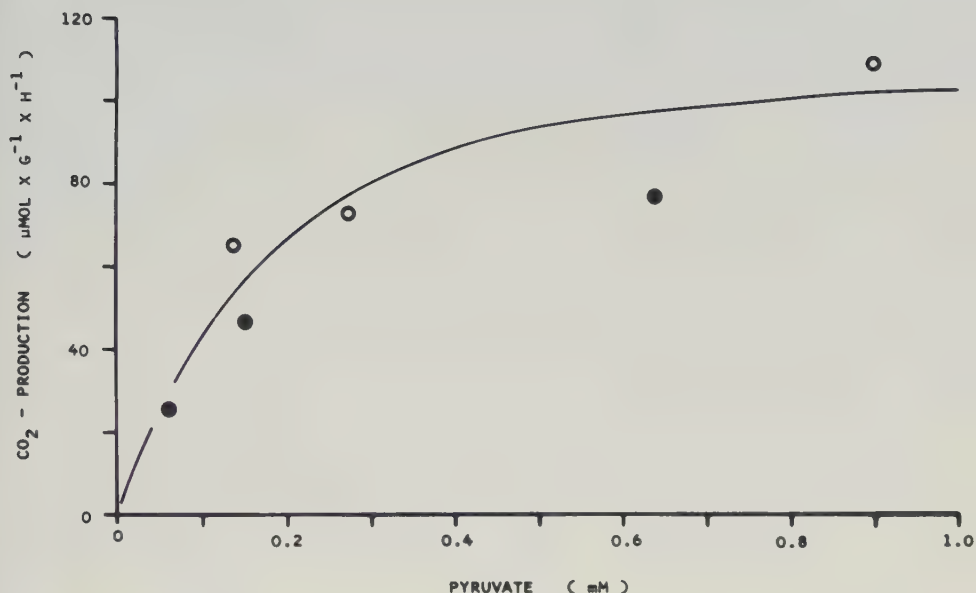


Abb. 28 Beziehung zwischen Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung (Ordinate) und extrazellulärer Pyruvatkonzentration (Abszisse: arithmetisches Mittel aus arterieller und venöser Pyruvatkonzentration) in Anwesenheit (●) und Abwesenheit (○) von Äthanol (1,6 mM).

ist bereits ein Maximalwert, der auch bei höheren Pyruvatkonzentrationen nicht übertroffen wird (Abb. 30). Die relative Steigerung der PDH-Reaktion durch Dinitrophenol nimmt deshalb mit steigender Pyruvatkonzentration ab und beträgt bei 5 mM Pyruvat nur noch 40% (Abb. 31). Aus diesem Experiment gewinnt man den Eindruck, daß die PDH-Aktivität unter dem Einfluß von Dinitrophenol größer ist als die maximale Geschwindigkeit, die mit sehr hohen Pyruvatkonzentrationen erreicht werden kann (siehe Extrapolation auf unendlich hohe Pyruvatkonzentrationen in Abb. 21). Offensichtlich besteht ein teilweise additiver Effekt von Pyruvat und Dinitrophenol auf die PDH-Aktivität, eine Beobachtung, die auch an isolierten Hepatozyten gemacht wurde [48].

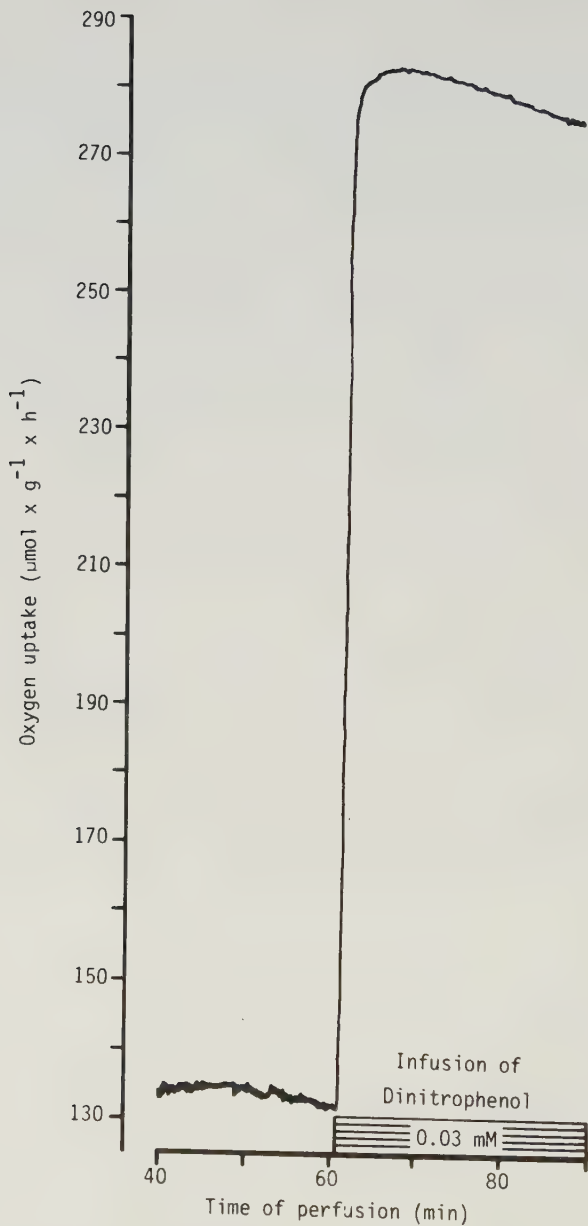


Abb. 29 Effekt von Dinitrophenol auf den Sauerstoffverbrauch einer perfundierten Rattenleber. Originalregistrierung der Sauerstoffkonzentration im venösen Perfusat. Die Infusion von Dinitrophenol mit einer Konzentration von 0,03 mM im Perfusat ist durch einen horizontalen Balken angegeben.

EFFECT OF DINITROPHENOL ON RATES OF PYRUVATE DECARBOXYLATION

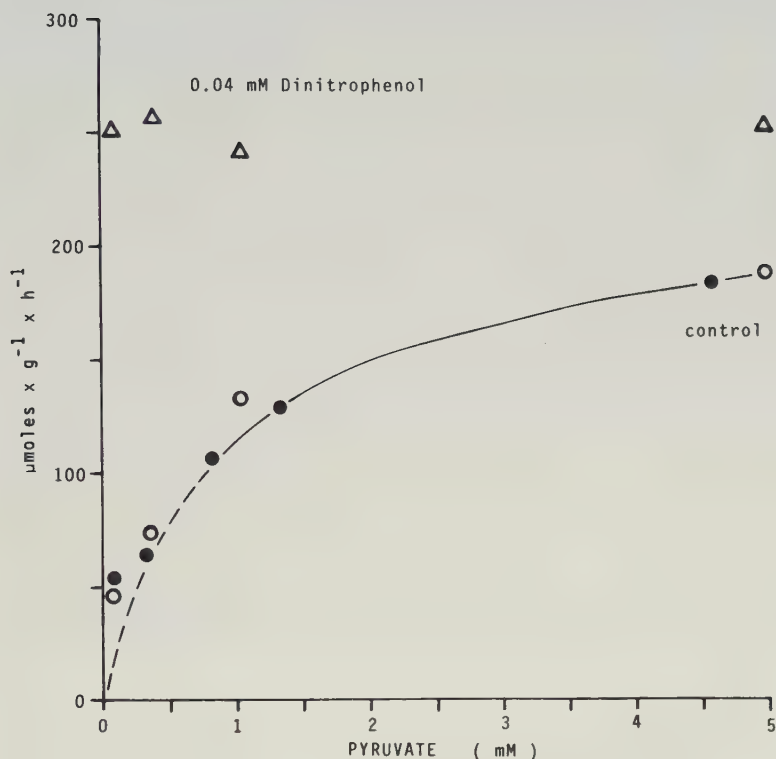


Abb. 30 Einfluß von Dinitrophenol (0,04 mM) bei unterschiedlichen Pyruvatkonzentrationen auf die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion. Ordinate: CO_2 -Produktion ($\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Abszisse: arithmetisches Mittel der arteriellen und venösen Pyruvatkonzentration (mM). In jeweils einem Perfusionsexperiment mit konstanter Pyruvatkonzentration im arteriellen Perfusat wurde nach Bestimmung des Kontrollwertes (o) Dinitrophenol infundiert. Wenn die Registrierung des Sauerstoffverbrauchs (siehe Abb. 29) nach 6 Minuten einen Maximalwert erreichte, wurde die Pyruvatdecarboxylierungsgeschwindigkeit erneut bestimmt (Δ). Das Diagramm enthält Wertepaare (o und Δ) aus vier Experimenten mit Pyruvatkonzentrationen zwischen 0,05 und 5 mM. Außerdem sind Mittelwerte aus Abb. 20 eingezeichnet ($\bullet$).

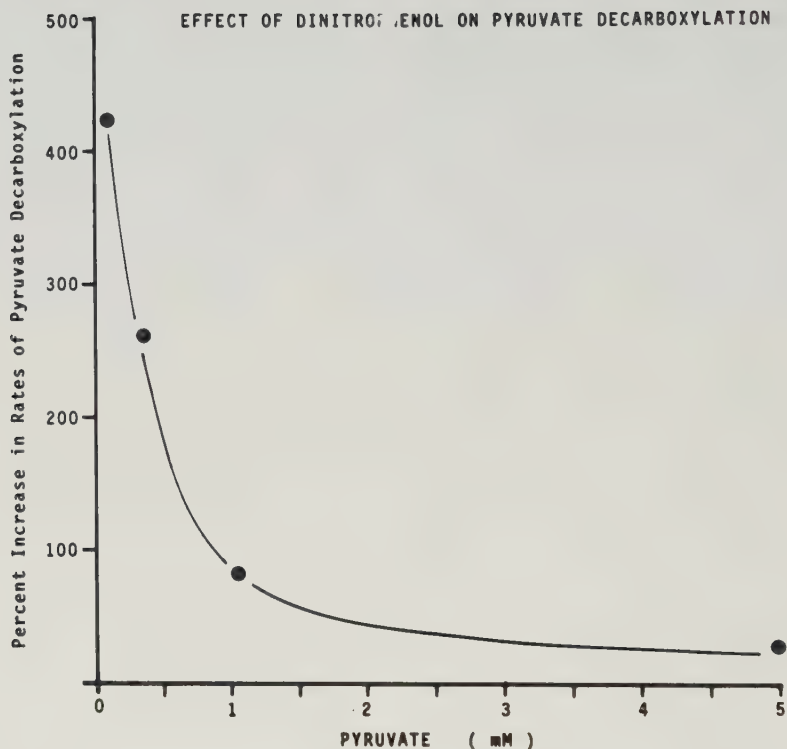


Abb. 31 Stimulierung der Pyruvatdecarboxylierung durch Dinitrophenol in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration. Angabe in Prozent des Kontrollwertes. Ergebnisse aus Abb. 30.

3.2.7. Abhängigkeit der PDH-Reaktion von Ammoniumionen

Es wurde kürzlich beschrieben, daß nach Zufuhr von Ammonium zur perfundierten Leber die PDH-Aktivität gesteigert wird [25]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Interkonversion der PDH und der Harnstoffsynthese aus exogenem Ammonium wurde diskutiert. Nach diesen Untersuchungen soll der Mechanismus für die PDH-Aktivierung nicht in Änderungen des ATP-Gehalts aufgrund des gesteigerten ATP-Verbrauchs für die Harnstoffsynthese liegen. Statt dessen wird ein Absinken der mitochondrialen Konzentration des α -Ketoglutarat, das für die reduktive Aminierung bei der Ammoniakfixierung benötigt wird, als Ursache für die Interkonversion der PDH diskutiert. Weiterhin wurde

EFFECT OF AMMONIUM ON PYRUVATE DECARBOXYLATION

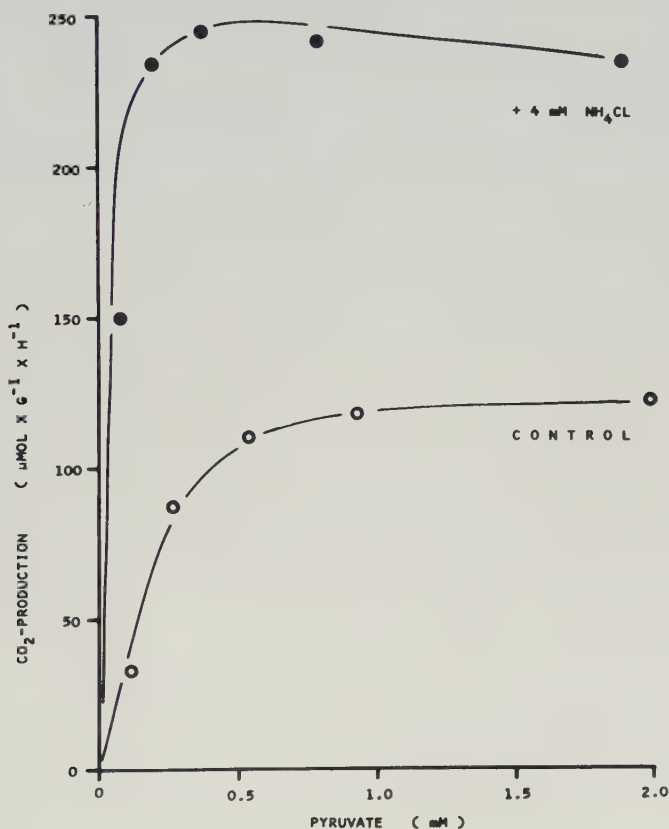


Abb. 32 Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration in Anwesenheit (●—●) und in Abwesenheit (○—○) von Ammoniumionen. Ordinate: CO₂-Produktion in $\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$. Abszisse: Pyruvatkonzentration in mM. Einfluß der Ammoniumionen auf die PDH-Reaktion. In einem Perfusionsexperiment wurde stufenweise die Pyruvatkonzentration erhöht; auf jeder Stufe wurde zunächst die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung bestimmt (Kontrolle: ○); anschließend wurde Ammoniumchlorid (4 mM) infundiert und 6 Minuten später erneut die Pyruvatdecarboxylierung gemessen (●) und danach die Ammoniumchloridinfusion abgesetzt. Nach weiteren 8 Minuten wurde die Pyruvatkonzentration erhöht etc.

beschrieben, daß die $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat-1- ^{14}C nach Zugabe von Ammoniumionen ansteigt, was mit einem erhöhten Fluß durch die PDH-Reaktion interpretiert wurde. In diesen Experimenten konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden, ob die Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion möglicherweise durch eine vermehrte Carboxylierung von Pyruvat-1- ^{14}C mit anschließender Decarboxylierung im Citratcyclus verursacht wurde. Aus diesem Grunde wurde der Effekt von Ammoniumionen auf die Decarboxylierungsgeschwindigkeit von Pyruvat-1- ^{14}C mit unserer kinetischen Methode untersucht.

Der Anteil der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion, welcher der PDH-Reaktion zugeschrieben werden kann, ist in Anwesenheit von 4 mM Ammoniumchlorid deutlich erhöht (Abb. 32). Die Interpretation, die Häussinger et al. [25] ihren Befunden gaben, konnte damit bestätigt werden. Aus Abb. 31 ist zu entnehmen, daß in Anwesenheit von Ammoniumchlorid bereits bei Konzentrationen um 0,5 mM Pyruvat eine maximale Decarboxylierungsgeschwindigkeit erreicht wird. Im Bereich zwischen 1 und 2 mM Pyruvat beträgt die durch Ammoniumionen bedingte Steigerung der Geschwindigkeit ungefähr 80%. Zwar wurden in dem Experiment, das in Abb. 32 wiedergegeben ist, keine Pyruvatkonzentrationen über 2 mM eingesetzt; jedoch lassen die Experimente vermuten, daß in Anwesenheit von 4 mM Ammoniumchlorid eine höhere Decarboxylierungsgeschwindigkeit erreicht wird als mit hohen Pyruvatkonzentrationen allein beobachtet wird (siehe Pyruvat-Titration Abb. 21). Offensichtlich liegt bei dem Effekt von Ammoniumionen eine ähnlich additive Wirkung zur Pyruvatkonzentration vor, wie sie bereits oben für Dinitrophenol beschrieben wurde.

3.2.8. Abhängigkeit der PDH-Reaktion von der Fettsäureoxydation

Beobachtungen an isolierten Mitochondrien, die bereits zehn bis zwanzig Jahre zurückliegen, haben wiederholt gezeigt, daß die Pyruvatoxydation vermindert ist, wenn die Mitochondrien gleichzeitig Fettsäuren oxydieren [45]. Dieser lange Zeit unverständliche Befund konnte erklärt werden, als man entdeckte, daß der Aktivierungsgrad der PDH in verschiedenen Geweben vermindert ist, wenn die Fettsäurekonzentration im Serum oder der Acyl-CoA-Gehalt im Gewebe erhöht sind [24]. Offensichtlich beeinflussen Fettsäuren oder Metabolite der Fettsäureoxydation das System der Interkonvertierung der PDH. Es wird eine indirekte Beeinflussung der PDH_a -Kinase diskutiert [46]. Infrage kommen Änderungen der CoenzymA- und Acetyl-CoA Konzentrationen sowie Änderungen im Redoxstatus des mitochondrialen

NAD⁺-Systems [46]. Außerdem werden Änderungen im mitochondrialen ATP/ADP System während gesteigerter Fettsäureoxydation für die Inaktivierung der PDH verantwortlich gemacht [47]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht geklärt.

In Experimenten mit perfundierten Rattenlebern wurde der Einfluß von Fettsäureinfusionen auf die Geschwindigkeit der oxydativen Pyruvatdecarboxylierung untersucht. Es wurden Versuche mit Octanoat und Oleat durchgeführt. Diese beiden Fettsäuren unterscheiden sich hinsichtlich der Lokalisation ihrer Aktivierung zum CoA-Derivat. Oleat wird durch extramitochondriale Acyl-CoA-Synthetasen aktiviert und muß dann mit Hilfe des Carnitin-Systems in die Mitochondrien transportiert werden. Octanoat dagegen kann sowohl extra- als auch intramitochondrial aktiviert werden. Die intramitochondriale Reaktion soll GTP-abhängig sein [50]. Unsere Versuche wurden mit Konzentrationen zwischen 0,05 und 0,8 mM Fettsäure im arteriellen Perfusat durchgeführt. Während Octanoat in diesen Konzentrationen noch wasserlöslich ist, mußte Oleat in Form einer Emulsion mit Albumin infundiert werden.

Es zeigte sich, daß die Wirkung der Fettsäureinfusionen auf die Pyruvatdecarboxylierung von der Pyruvatkonzentration abhängt. Bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen (unter 0,5 mM) kommt es zu einer Stimulierung. Im Bereich um 1 mM war kein Effekt nachweisbar. Dagegen wurde bei Konzentrationen über 2 mM eine Hemmung der PDH-Reaktion beobachtet (Abb. 33). Es bestand kein Unterschied zwischen Octanoat- und Oleatinfusionen. Daraus kann geschlossen werden, daß der unterschiedliche Mechanismus für die Aktivierung dieser beiden Fettsäuren ohne Bedeutung für die Beeinflussung der PDH-Reaktion ist. Abb. 34 zeigt die Abhängigkeit der PDH-Reaktion von der Octanoatkonzentration. Halbmaximale Stimulierung der Decarboxylierung bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen und halbmaximale Hemmung bei hohen Pyruvatkonzentrationen wurden jeweils mit Octanoatkonzentrationen zwischen 0,05 und 0,1 mM erreicht. Die Fettsäuren beeinflussen die oxydative Pyruvatdecarboxylierung folglich in einem Konzentrationsbereich, der den Fettsäurekonzentrationen im Serum unter in vivo Bedingungen entspricht.

Die Hemmung der Pyruvatdecarboxylierung bei hohen Pyruvatkonzentrationen bestätigt die Beobachtungen an isolierten Mitochondrien [23]. Eine Stimulierung bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen wurde jedoch bisher nicht beschrieben. Dieser Befund steht im Gegensatz zu der Vorstellung der PDH-Regulation in Abhängigkeit vom metabolischen Zustand der Leber (d.h. Übergang von Kohlenhydraternährung

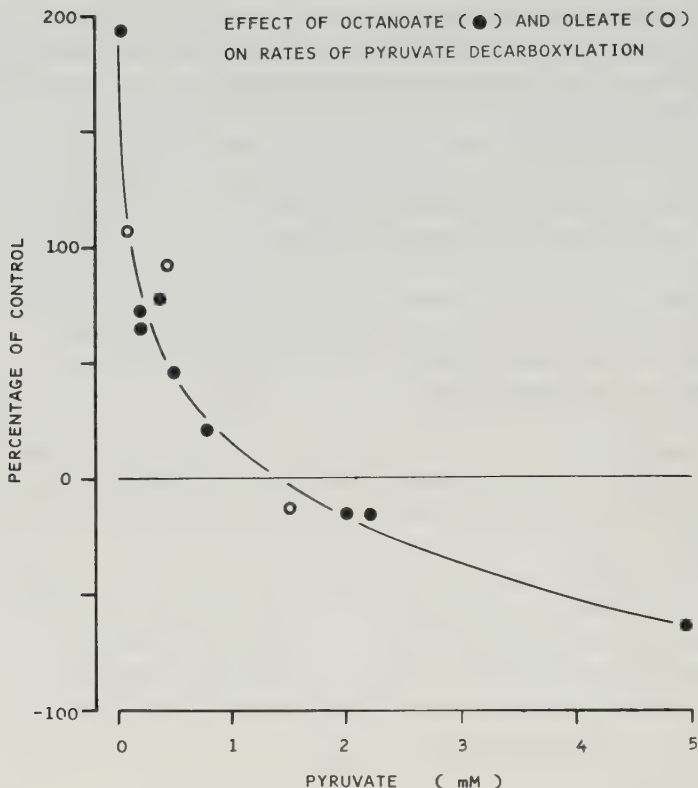


Abb. 33 Einfluß von Fettsäuren auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung in Abhängigkeit von der Pyruvatkonzentration. Abszisse: arithmetisches Mittel aus arterieller und venöser Pyruvatkonzentration (mM). Ordinate: Steigerung bzw. Verminderung der Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung nach Zugabe von Fettsäuren in Prozent der Kontrollwerte. Experimente mit 0,5 mM Octanoat (●) bzw. mit 0,25 mM Oleat als Albumin-Emulsion (○).

zu Fetterernährung bzw. Hunger etc., siehe Abb. 1 und Tab. 1). Es muß jedoch betont werden, daß diese Vorstellungen auf in vitro Experimenten basieren, die mit hohen Pyruvatkonzentrationen (d. h. 2–5 mM) [23, 24, 27, 45, 46, 47] durchgeführt wurden. Unsere Beobachtung, daß in der perfundierten Leber die Pyruvatdecarboxylierung bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen durch Fettsäuren stimuliert werden kann, wurde inzwischen durch Untersuchungen an isolierten Hepatozyten

EFFECT OF OCTANOATE
ON RATES OF PYRUVATE DECARBOXYLATION
IN PRESENCE OF 0.25 mM (●▲) OR 2 mM (○) PYRUVAT

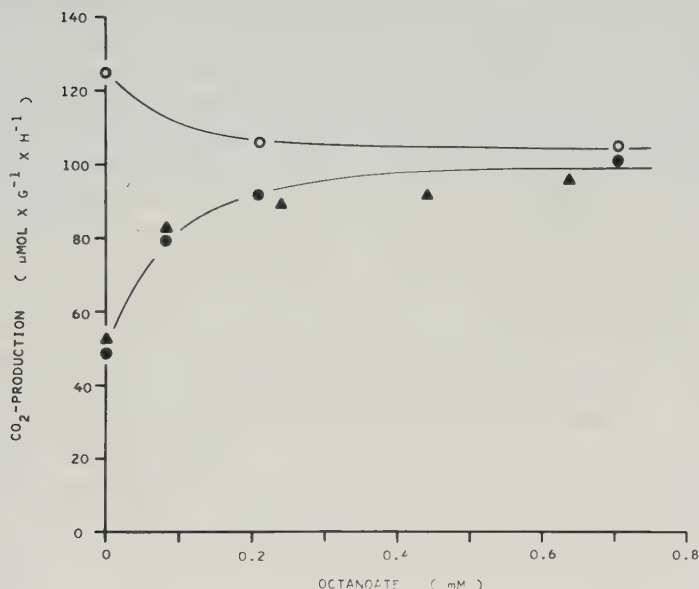


Abb. 34 Abhängigkeit des Fettsäure-Effektes auf die Pyruvatdecarboxylierung von der Octanoatkonzentration. Abszisse: Octanoatkonzentration im arteriellen Perfusat (mM); Ordinate: Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung ($\mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$). Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von drei Experimenten, bei denen der Octanoat-Effekt bei verschiedenen Pyruvatkonzentrationen titriert wurde: ● ▲ bei 0,25 mM, ○ bei 2 mM Pyruvat im arteriellen Perfusat.

und Lebermitochondrien bestätigt [49]. Die bisher vorliegenden Experimente liefern keine Erklärung für den Mechanismus, welcher der Stimulierung der Pyruvatdecarboxylierung durch Fettsäuren zugrunde liegt. Unsere Experimente zeigen, daß das Problem der Wechselwirkung von Fettsäureoxydation und Pyruvatdecarboxylierung noch nicht gelöst ist und daß weitere in vitro und in vivo Experimente notwendig sind.

4. Zusammenfassende Schlußbetrachtung

Der Multienzymkomplex der Pyruvatdehydrogenase (PDH) katalysiert im Stoffwechsel der Säugetiere die oxydative Decarboxylierung des Pyruvats zum Acetyl-CoA. Beim Abbau der Kohlenhydrate entsteht Pyruvat; für die Fettsäuresynthese ist Acetyl-CoA der Baustein. Somit ist die PDH-Reaktion ein wichtiges Bindeglied zwischen Kohlenhydrat-katabolismus und Fettsäureanabolismus.

Die zentrale Bedeutung der PDH-Reaktion kommt auch in der Komplexität ihrer Regulation zum Ausdruck. An der Regulation dieses Enzyms sind zwei Mechanismen beteiligt. Durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung mit Hilfe zweier spezifischer Enzyme wird die PDH inaktiviert bzw. aktiviert, ein Prozeß, der als Interkonversion bezeichnet wird. Die aktive Form der PDH wird dagegen im Sinne einer Produkthemmung durch NADH und Acetyl-CoA reguliert.

Diese verschiedenen Regulationsmechanismen und die dabei beteiligten Effektoren wurden an Enzympräparationen, Gewebshomogenaten und isolierten Mitochondrien aufgeklärt. Dagegen ist nicht genau bekannt, welche Rolle diese Mechanismen unter in vivo Bedingungen spielen. Die Regulation der PDH-Reaktion wurde bislang durch Messungen der Enzymaktivitäten in verschiedenen Geweben untersucht. Diese Messungen liefern aber lediglich Hinweise über die Kapazität des Enzyms. Eine Beteiligung der Produkthemmung wird dabei nicht erfaßt. Um die Regulation der PDH-Reaktion zu untersuchen, ist deshalb eine Messung des Substratdurchflusses erforderlich, die aber erschwert ist, weil die Produkte nicht direkt faßbar sind. Andererseits ist die Messung der Decarboxylierung von Pyruvat-1- ^{14}C unsicher, weil die Radioaktivität des Praekursors im Stoffwechsel der Leberzelle verdünnt wird und mehrere andere Decarboxylierungsreaktionen zur $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion beitragen. Es war deshalb die Aufgabe dieser Arbeit, einen methodischen Weg zu finden, der diese Unsicherheit ausräumt.

Mit der hier vorgestellten Methode ist es möglich, den tatsächlichen Substratdurchfluß durch die PDH-Reaktion unter verschiedenen Bedingungen zu messen. Die Betrachtung und Auswertung kinetischer Gegebenheiten zusammen mit der Anwendung der Perfusionsmethode hat es ermöglicht, die Aussagekraft der Perfusionsexperimente in bezug auf die PDH-Reaktion bedeutend zu erhöhen. Die vorgestellte Methode gestattet es, Erkenntnisse über diesen Stoffwechselweg an einem intakten Organ zu gewinnen. Die Versuchsbedingungen können so gewählt werden, daß sie physiologischen Zuständen weitgehend entsprechen. Deshalb können die so gewonnenen Ergebnisse mit we-

niger Einschränkungen auf den Gesamtorganismus übertragen werden als es mit Ergebnissen aus Experimenten mit Gewebshomogenaten, isolierten Mitochondrien oder Enzympräparationen möglich ist.

Die Messungen der Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung beruhen auf der Auswertung von Auswaschkinetiken eines radioaktiv markierten Produktes der PDH-Reaktion, nämlich des $^{14}\text{CO}_2$, das aus Pyruvat-1- ^{14}C als Praekursor entsteht. Diese Kinetiken lassen regelmäßig mehrere konstante Abschnitte erkennen. Die Teilkurve mit der kürzesten stoffwechselbedingten Halbwertszeit kann der PDH-Reaktion zugeordnet werden. Die anderen Teilkurven wurden zwar bislang nur als PDH-unabhängig identifiziert; sie erlauben es aber, die Auswaschkinetik durch Subtraktion der nicht PDH-bedingten Anteile so zu korrigieren, daß daraus die PDH-bedingten Werte resultieren. Mittels der Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der einzelnen Metabolite konnte die intrazelluläre Verdünnung des radioaktiven Praekursors und darauf aufbauend die gesamte PDH-bedingte CO_2 -Produktion als Maß für den Stoffwechselfluß durch die PDH-Reaktion ermittelt werden. In Zukunft könnte es möglich sein, die anderen Abschnitte der Auswaschkinetik ebenso einzelnen Stoffwechselschritten zuzuordnen. Auch scheint die Möglichkeit gegeben, sowohl andere Praekursoren als auch andere Metabolite zur Erfassung von analogen Auswaschkinetiken bei der Bearbeitung ähnlicher Probleme zu verwenden.

Die Bestimmung der Geschwindigkeit der PDH-Reaktion in Abhängigkeit von der extrazellulären Pyruvatkonzentration zeigte eine mit steigenden Pyruvatkonzentrationen kontinuierlich ansteigende Reaktionsgeschwindigkeit. Die bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen gemessenen Werte zeigen eine signifikante Abweichung von der exponentiell verlaufenden Idealkurve, die in Zusammenhang mit den unterschiedlichen Regulationsmechanismen der PDH stehen könnte. Diese Vermutung wird unterstrichen durch die Ergebnisse von Versuchen, bei denen Dichloracetat, ein Hemmstoff der PDH-Kinase, infundiert wurde. Die Folge ist ein Überwiegen der durch die Phosphatase katalysierten Aktivierungsreaktion und damit ein erhöhter Anteil von aktiver PDH am insgesamt vorhandenen Enzym. In Anwesenheit von Dichloracetat ist demnach eine Regulation der PDH durch Interkonversion nicht möglich. Die unter diesen Bedingungen gemessenen Werte der Pyruvattitration liegen alle auf einer Exponentialkurve, welche steiler verläuft als die ohne Dichloracetat ermittelte, jedoch die gleiche Maximalgeschwindigkeit erkennen läßt. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird unter Dichloracetatinfusion (3 mM) bei 0,2 mM Pyruvat erreicht. Aus den Meßwerten, die ohne und mit Dichloracetat erhalten

werden, ließ sich eine Maximalgeschwindigkeit der PDH-Reaktion extrapolieren, die nach Umrechnung auf 25° C eine gute Übereinstimmung mit den an Enzympräparationen, isolierten Mitochondrien und Gewebshomogenaten gefundenen Werten zeigt. Die Übereinstimmung bestätigt die Zuverlässigkeit der vorgestellten Methode.

Das Redoxpotential des mitochondrialen NAD^+ -Systems wurde in mehreren Versuchen variiert. Dabei war kein deutlicher Effekt auf die PDH-Reaktion feststellbar. Hingegen konnte durch Änderungen des energetischen Zustands eine starke Erhöhung der Geschwindigkeit der PDH-Reaktion erreicht werden. Infusionen von Glucose und Fructose hatten keinen deutlichen Effekt auf die PDH-Reaktion.

Die Messung der Pyruvatdecarboxylierungsgeschwindigkeit unter dem Einfluß der gleichzeitig ablaufenden Fettsäureoxydation brachte neue Ergebnisse. In der Literatur wird eine Hemmung der PDH erhöhte Fettsäurekonzentrationen angegeben. Dabei waren die verwendeten Pyruvatkonzentrationen regelmäßig hoch, d.h. über 2 mM. Unter diesen Bedingungen konnten wir den Befund bestätigen. Wurde jedoch eine niedrige Pyruvatkonzentration ($< 0,5$ mM) gewählt, so wurde eine Stimulierung der PDH-Reaktion durch Fettsäuren beobachtet. Dieses Phänomen kann mit den derzeitigen Vorstellungen über die Regulation der PDH nicht erklärt werden. Es ist jedoch auch nicht möglich, aus den bisher vorliegenden Experimenten eine Modifizierung des Schemas der PDH-Regulation herzuleiten. Um diesen Effekt der Fettsäureoxydation mit den anderen Ergebnissen in Einklang zu bringen, bedarf es noch weiterer Experimente.

Obwohl im Laufe der letzten Jahre viele Ergebnisse in bezug auf die PDH bekannt geworden sind, kann ein endgültiges Bild über die Bedeutung und Regulation dieses Multienzymkomplexes noch nicht gegeben werden. Vielmehr scheint es, daß anscheinend gelöste Probleme sich bei näherer Betrachtung wieder differenzierter darstellen und deshalb die Vorstellungen über die komplexe Regulation der PDH erneut modifiziert werden müssen.

5. Zusammenfassung

Die Durchflußgeschwindigkeit durch die PDH-Reaktion in der perfundierten Rattenleber wurde mit Hilfe der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion aus Pyruvat- $1\text{-}^{14}\text{C}$ gemessen. Mittels der spezifischen Aktivität von Lactat, die ein Maß für die Verdünnung des Praekursors lieferte und einer Analyse der Auswaschkurven der $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion konnte die Geschwindigkeit der oxydativen Decarboxylierung des Pyruvats nahezu quantitativ erfaßt werden.

Mit Hilfe dieser Methode wurden an perfundierten Lebern von normal gefütterten Ratten folgende Fragen zur Geschwindigkeit der PDH-Reaktion bearbeitet:

1. Einfluß der extrazellulären Pyruvatkonzentration. Eine halbmaximale Geschwindigkeit wurde bei 0,9 mM Pyruvat beobachtet. Die maximale Geschwindigkeit betrug $230 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$.
2. Effekt von Dichloracetat. Bei Infusion von 3 mM Dichloracetat wurde die maximale Decarboxylierungsgeschwindigkeit des Pyruvats bereits bei Pyruvatkonzentrationen von 0,2 mM erreicht. Eine Steigerung der Maximalgeschwindigkeit wurde nicht beobachtet.
3. Temperaturabhängigkeit. Im Temperaturbereich zwischen 37°C und 10°C wurde im Arrhenius-Plot eine lineare Beziehung zwischen $\log V$ und $\frac{1}{T}$ gefunden. Daraus wurde ein Q_{10} von 3,2 und eine Aktivierungsenergie von 19 kcal/Mol entsprechend 80 kJoule/Mol errechnet.
4. Abhängigkeit von extrazellulären Zuckerkonzentrationen. Infusionen von Glucose und Fructose, deren Konzentrationen zwischen 4 mM und 34 mM schwankten, ließen keine eindeutige Beeinflussung der PDH-Reaktion erkennen.
5. Einfluß des Redoxpotentials des mitochondrialen NAD^+ -Systems. Durch Infusionen von Acetoacetat bzw. β -Hydroxybutyrat wurde versucht, das mitochondriale NAD^+ -System zu oxydieren bzw. zu reduzieren. Die Infusion dieser beiden Ketonkörper hatte keinen deutlichen Effekt auf die PDH-Reaktion. Außerdem wurde versucht, durch Infusion von Äthanol über eine Reduktion des cytosolischen NAD^+ -Systems das mitochondriale NAD^+ -System gleichsinnig zu beeinflussen. Bei niedriger Pyruvatkonzentration bewirkte Äthanol eine Verminderung der Pyruvatdecarboxylierung, während bei hohen Pyruvatkonzentrationen Äthanol keinen Effekt hatte. Die Ergebnisse lassen sich weniger durch einen Einfluß auf das mitochondriale Redoxpotential als durch eine Erniedrigung der zellulären Pyruvatkonzentration als Folge der Äthanol oxydation erklären.

6. Abhängigkeit vom energetischen Zustand. Die Maximalgeschwindigkeit der PDH-Reaktion wurde durch Dinitrophenol auf $251 \mu\text{Mol} \times \text{g}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ erhöht. Sie wurde bereits bei einer Pyruvatkonzentration von 0,1 mM erreicht.

7. Abhängigkeit von Ammoniumionen. Infusion von Ammoniumchlorid steigerte die Geschwindigkeit der PDH-Reaktion. Bereits bei einer Pyruvatkonzentration von 0,5 mM wurde eine Maximalgeschwindigkeit erreicht, die höher lag als die durch hohe Pyruvatkonzentration allein erreichbare.

8. Abhängigkeit von der Fettsäureoxydation. Es wurden Versuche mit Octanoat- und Oleatinfusionen durchgeführt. Ihre Wirkung auf die Geschwindigkeit der Pyruvatdecarboxylierung hing von der gleichzeitig vorhandenen Pyruvatkonzentration ab. Bei Pyruvatkonzentrationen unter 0,5 mM wurde die PDH-Reaktion stimuliert; im Bereich von 1 mM Pyruvat wurde sie nicht beeinflusst, während sie im Bereich von mehr als 2 mM Pyruvat gehemmt wurde. Octanoat und Oleat zeigten eine gleichartige Wirkung. Der Mechanismus für die unterschiedlichen Effekte der Fettsäureoxydation auf die PDH-Reaktion konnte nicht erklärt werden.

Literaturverzeichnis

- 1 Linn, T. C., Pettit, F. H., & Reed, L. J. (1969)
Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes: X. Regulation of Activity of Pyruvate Dehydrogenase Complex from Beef Kidney Mitochondria by Phosphorylation and Dephosphorylation
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 234–241
- 2 Linn, T. C., Pettit, F. H., Hucho, F., Reed, L. J. (1969)
 α -Keto Acid Dehydrogenase Complexes XI
Comparative Studies of Regulatory Properties of the PDH Complexes from Kidney, Heart, and Liver Mitochondria
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 227–234
- 3 Wieland, O. H., und v. Jagow-Westermann, B. (1969)
ATP-dependent Inactivation of Heart Muscle Pyruvate Dehydrogenase and Reactivation by Mg^{++}
FEBS Lett. 3, 271–274
- 4 Wieland, O., Siess, E. (1970)
Interconversion of Phospho- and Dephospho-forms of Pig Heart PDH
Proc. Nat. Acad. Sci. 65, 947–954
- 5 Siess, E., Wittmann, J., Wieland, O. (1971)
Interconversion and Kinetic Properties of PDH from Brain
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 447–452
- 6 Siess, E. A., Wieland, O. H. (1972)
Purification and Characterization of PDH Phosphatase
Eur. J. Biochem. 26, 96–105
- 7 Linn, T. C., Pelley, J. W., Pettit, F. H., Hucho, F., Randall, D. D. & Reed, L. J. (1972)
Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes. 15. Purification and Properties of Component Enzymes of Pyruvate Dehydrogenase Complexes from Bovine Kidney and Heart
Arch. Biochem. Biophys. 148, 327–342
- 8 Barrera, C. R., Namihiro, G., Hamilton, L., Munk, P., Eley, M. H. Linn, T. C. & Reed, L. J. (1972)
Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes 16. Studies on Subunit Structure of Pyruvate Dehydrogenase Complexes from Bovine Kidney and Heart
Arch. Biochem. Biophys. 148, 343–358
- 9 Koike, M., Reed, L. J., & Carroll, W. R. (1963)
Alpha-Keto Acid Dehydrogenation Complexes IV Resolution and Reconstitution of the Escherichia coli Pyruvate Dehydrogenation Complex
J. Biol. Chem. 238, 30–39
- 10 Hayakawa, T., Kanzaki, T., Kitamura, T., Fukuyoshi, Y., Sakurai, Y., Koike, K., Suematsu, T., & Koike, M. (1969)
Mammalian Alpha-Keto Acid Dehydrogenase Complexes V. Resolution and Reconstitution Studies of Pig Heart Pyruvate Dehydrogenase Complex.
J. Biol. Chem. 244, 3660–2670

- 11 Glemja, A. A., Zilber, L. S., & Severin, S. E. (1966)
Separation and Characteristics of Three Components of Muscle Pyruvate Dehydrogenase
Biokhimiya 31, 1033–1040
- 12 Reed, L. J. (1968)
Oxidation of Alpha-Keto Acids
J. vitaminol 14, 77
- 13 Tsai, C. S., Reed, L. J. (1973)
Catalytic Sites and Mechanism of Mammalian Dihydrolipoyl Transacetylase
Fed. Proc. 32, 627
- 14 Schuster, S. M., Olson, M. S. (1974)
The Regulation of PDH in Isolated Beef Heart Mitochondria. The Role of Calcium, Magnesium, and Permeant Anions
J. Biol. Chem. 249, 7158–7165
- 15 Walajtys, E. I., Gottesmann, D. P., Williamson, J. R. (1973)
Regulation of PDH in Rat Liver Mitochondria by Phosphorylation-Dephosphorylation
J. Biol. Chem. 249, 1857–1865
- 16 Chiang, P. K., Sacktor, B. (1975)
Control of PDH Activity in Intact Cardiac Mitochondria Regulation of the Inactivation and Activation of the Dehydrogenase
J. Biol. Chem. 250, 3399–3408
- 17 Moe, O. A., Hammes, G. G. (1974)
A Study of the Binding of Thiamine Diphosphate and Thiochrome Diphosphate to the PDH Multienzyme Complex
Biochemistry 13, 2547–2552
- 18 Moe, O. A., Lerner, D. A., Hammes, G. G. (1974)
Fluorescence Energy Transfer Between the Thiamine Diphosphate and Flavine Adenine Dinucleotide Binding Sites on the PDH Multienzyme Complex
Biochemistry 13, 2553–2557
- 19 Coore, H. G., Field, B. (1974)
Properties of PDH of Rat Mammary Tissue and its Changes during Pregnancy, Lactation and Weaning
Biochem. J. 142 87–95
- 20 Taylor, S. I., Mukherjee, C., Jungas, R. L. (1975)
Regulation of PDH in Isolated Rat Liver Mitochondria Effects of Octanoate, Oxidation-Reduction State, and Adenosine Triphosphate to Adenosine Diphosphate Ratio
J. Biol. Chem. 250, 2028–2035
- 21 Taylor, S. I., Jungas, R. L. (1974)
Regulation of Lipogenesis in Adipose Tissue: the Significance of the Activation of PDH by Insulin
Arch. Biochem. Biophys. 164 12–19
- 22 Söling, H. D., Bernhard, G. (1971)
Interconversion of Inactive to Active PDH in Rat Liver after Fructose Application in Vivo
FEBS Lett. 13, 201–203

- 23 Portenhauser, R., Wieland, O. (1972)
Regulation of PDH in Mitochondria of Rat Liver
Eur. J. Biochem. 31, 308–314
- 24 Patzelt, C., Löffler, G., Wieland, O. H. (1973)
Interconversion of PDH in the Isolated Perfused Rat Liver
Eur. J. Biochem. 33, 117–122
- 25 Häussinger, D., Weiss, R. L., Sies, H. (1975)
Activation of PDH during Metabolism of Ammonium Ions in Hemoglobinfree Perfused Rat Liver
Eur. J. Biochem. 52, 421–431
- 26 Weiss, L., Löffler, G., Wieland, O. H. (1974)
Regulation by Insulin of Adipose Tissue PDH
A Mechanism Controlling Fatty Acid Synthesis from Carbohydrates
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 363–377
- 27 Wieland, O. H., Patzelt, C., Löffler, G. (1972)
Active and Inactive Forms of PDH in Rat Liver
Effect of Starvation and Refeeding and of Insulin Treatment on PDH Interconversion
Eur. J. Biochem. 26, 426–433
- 28 Corey, E. L., Britton, S. W. (1941)
Glycogen Levels in the Isolated Liver Perfused with Cortico-Adrenal Extract, Insulin and Other Preparations
Amer. J. Physiol. 131, 783
- 29 Trowell, O. A. (1942)
Urea Formation in the Isolated Perfused Liver of the Rat
J. Physiol. 100, 432
- 30 Brauer, R. W., Pesotti, R. L., Pizzolato, P. (1951)
Isolated Rat Liver Preparation. Bile Production and Other Basic Properties
Proc. Soc. exp. Biol. 78, 174
- 31 Miller, L. L., Bly, C. G., Watson, M. L., Bale, W. B. (1951)
The Dominant Role of the Liver in Plasma Protein Synthesis. A Direct Study of the Isolated Perfused Rat Liver with the Aid of Lysine- e - ^{14}C
J. exp. Med. 94, 431
- 32 Schimassek, H. (1962)
Perfusion of Isolated Rat Liver with a Semi-Synthetic Medium and Control of Liver Function
Life Sciences 11, 629
- 33 Scholz, R., Bücher, Th. (1965)
Hemoglobin-free Perfusion of Rat Liver
In: Control of energy metabolism
Ed. B. Chance, Academic Press, New York, p. 393
- 34 Scholz, R. (1967)
Hämoglobinfreie Durchströmung der isolierten Rattenleber und Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung
Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät der Universität München

- 35 Krebs, H. A., Henseleit, H. (1932)
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper
Z. Physiol. Chem. 210, 33
- 36 Fischer, A., Molnar, G., Takacs, L. (1961)
Kreislauf und O₂-Verbrauch der Leber bei experimenteller Zirrhose
Acta Med. Sci. Hung. 17, 33
- 37 Clark, L. C. (1956)
Monitoring and Control of Blood O₂ Tensions
Amer. Soc. Art. Int. Organe 2, 41
- 38 Warburg, O. (1938)
Chemische Konstitution von Fermenten
Erg. Enzymforschung 7, 210
- 39 Scholz, R., Hansen, W., Thurman, R. G. (1973)
Interaction of Mixed Function Oxidation with biosynthetic Processes. 1. Inhibition of Glyconeogenesis by Aminopyrine in Perfused Rat Liver
Eur. J. Biochem. 38, 64–72
- 40 Busch, H., Hurlbert, B. R., van Potter, R. (1951)
Separation of Lactic, Succinic, and Malonic Acids by Ion-Exchange Chromatography
Fed. Proc. 10, 169
- 41 Mapes, J. P., Leland, M. C. & Harris, R. A. (1974)
Studies on Regulatory Role of Pyruvate Dehydrogenase and Mitochondrion in Lipogenesis
Fed. Proc. 33 (5), 1263
- 42 Dickerson and Geis (1969)
The Structure and Action of Proteins
Harper & Row, New York
- 43 Whitehouse, S., Cooper, R. H. & Randle, P. J. (1974)
Mechanism of Activation of Pyruvate Dehydrogenase by Dichloroacetate and Other Halogenated Carboxylic Acids
Biochem. J. 141, 761–774
- 44 Scholz, R. (1968)
Untersuchungen zur Redoxkompartimentierung bei der hämoglobinfrei perfundierten Leber
W. Staib und R. Scholz. Eds.
Springer Verlag Heidelberg-Berlin-New York, S. 22
- 45 Garland, P. B. & Randle, P. J. (1964)
Control of Pyruvate Dehydrogenase in the Perfused Rat Heart by the Intracellular Concentration of Acetyl-Coenzyme A
Biochem. J. 91, 6c–7c
- 46 Batenburg, J. J. & Olson, M. S. (1976)
Regulation of Pyruvate Dehydrogenase by Fatty Acid in Isolated Rat Liver Mitochondria
J. Biol. Chem. 251, 1364–1370

- 47 Siess, E. A. & Wieland, O. H. (1976)
Phosphorylation State of Cytosolic and Mitochondrial Adenine Nucleotides and of
Pyruvate Dehydrogenase in Isolated Rat Liver Cells
Biochem. J. 156, 91–102
- 48 Wieland, O. H., Siess, E. A.
Persönliche Mitteilung
- 49 Olson, M. S.,
Persönliche Mitteilung
- 50 Rossi, C. R. & Gibson, D. M. (1964)
Activation of Fatty Acids by a Guanosine Triphosphate-specific Thiokinase from Liver
Mitochondria
J. Biol. Chem. 239, 1694–1699

Herrn Prof. Dr. med. Roland Scholz möchte ich an dieser Stelle für die Unterstützung dieser Arbeit, seine Anregungen und seine großzügige Diskussionsbereitschaft danken.

Für ihre oft gewährte Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Christiane Plauk, Frau Gertraud Reiser und Frau Ursula Schwabe.

Lebenslauf

Ich, Wolfgang Braun, wurde am 26. 7. 1952 als Sohn der Eheleute Walter Braun und Erika Braun, geb. Rieder, in Nördlingen geboren.

Von September 1958 an besuchte ich die dortige Volksschule. Im September 1962 trat ich in das Theodor-Heuss-Gymnasium Nördlingen über, wo ich 1971 die Reifeprüfung bestand.

Seit dem Wintersemester 1971/72 bin ich als Student der Zahnheilkunde an der Ludwig Maximilians-Universität München immatrikuliert.

Nach zwei Semestern legte ich das Vorphysikum, nach fünf Semestern das Physikum ab. Im Sommer 1974 begann ich mit den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertationsarbeit bei Herrn Prof. Dr. R. Scholz im physiologisch-chemischen Institut der Universität. Nach zehn Semestern bestand ich am 7. 2. 1977 die „Zahnärztliche Prüfung“.

